

N° d'ordre : 428

50376
1989
295

50376
1989
295

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE FLANDRES ARTOIS

Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

par

Etienne BOUTRY



EXOGLYCOSIDASES DE *BIFIDOBACTERIUM* *BIFIDUM* SOUCHE AA 2/2 :

- I - Optimisation de la production des enzymes en fermenteur**
- II - Purification et propriétés d'une alpha-D-neuraminidase**



030 024527 2

Présentée le 12 Octobre 1989 devant la Commission d'Examen

Président :	J.	MONTREUIL
Rapporteur :	C.	ROMOND
Rapporteur :	H.C.	DUBOURGUIER
Examineur :	G.	SPIK
Examineur :	S.	BOUQUELET

Ce travail a été réalisé sous la direction de Monsieur le Professeur Stéphane BOUQUELET dans le Laboratoire de Chimie Biologique (Directeur : Professeur Jean MONTREUIL) de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois (Unité Mixte du CNRS n° 111 : Relations structure-fonction des constituants membranaires).

J'exprime ma sincère gratitude envers Monsieur le Professeur BOUQUELET qui m'a accueilli dans son laboratoire et m'a conseillé et guidé tout au long de cette étude.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur ROMOND qui nous a tout d'abord fourni la souche de *Bifidobacterium bifidum* et a aussi pris la responsabilité d'être le rapporteur de cette thèse.

J'exprime ma sincère gratitude envers Monsieur le Docteur DUBOURGUIER qui m'a accueilli et aidé pour les manipulations de fermentation et a accepté d'être le rapporteur de cette thèse.

Je remercie sincèrement Madame le Professeur SPIK qui a accepté de participer au jury de cette thèse.

A Monsieur le Professeur MONTREUIL qui m'a fait le très grand honneur d'accepter de présider le jury de cette thèse. Je vous exprime toute ma reconnaissance pour m'avoir permis d'effectuer ce travail au sein de votre Laboratoire.

Enfin, j'adresse mes remerciements les plus sincères à ceux qui par leurs conseils, leurs collaborations et leurs encouragements m'ont aidé dans ce travail et plus particulièrement à Laurence APPOURCHAUX.

ABREVIATIONS

TPY : Trypticase Peptone Yeast extract

GAL^{***} : Galactosidase

GlcNAc^{***} : N-acétyl- β -D-glucosaminidase

NeuAc^{***} : Neuraminidase

Fuc^{***} : Fucosidase

pNP-Gal : para Nitro-Phényl-Galactoside

pNP-GlcNAc : para Nitro-Phényl-N-acétyl-glucosaminide

MU-NeuAc : Acide 4-méthyl-Umbélliféryl- α -D-N-acétyl-Neuraminique

FPLC : Fast Protein Liquid Chromatography

Tris : Tris-hydroxyméthyl-aminométhane

EDTA : Acide éthylène diamine tétra acétique

SDS : Sodium dodécyl sulfate

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	p. 1
GENERALITES	p. 3
BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM	
I-BIOLOGIE DE BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM	p. 4
<u>A-INTRODUCTION</u>	
<u>B-CARACTERISTIQUES DU GENRE BIFIDOBACTERIUM</u>	p. 5
1-MORPHOLOGIE	
a-Historique	
b-Pléomorphisme et forme bifide	
c-Ultrastructure	p. 7
2-CARACTERISTIQUES PHYSIOLOGIQUES	p. 8
a-Anaérobiose	
b-Température et pH	
3-BESOINS NUTRITIONNELS	p. 9
a-Nutrition azotée	
b-Nutrition minérale	
c-Besoins vitaminiques	p. 10
d-Facteurs bifidigènes	
4-METABOLISME DES SUCRES	
a-Introduction	
b-Le shunt de la fructose-6-phosphate-cétolase	p. 11
c-Décarboxylation du pyruvate	
d-Formation de l'acétate et de l'éthanol	p. 13
e-Conclusion	
5-CONCLUSIONS	
<u>C-DETERMINATION DE L'ESPECE</u>	p. 15
1-INTRODUCTION	
2-DEGRADATION DES SUCRES	p. 17
3-HYBRIDATION ADN ADN	
4-CARACTERISATION DES PROTEINES	p. 19
5-COMPOSITION DE LA PAROI	
6-CONCLUSIONS	p. 21

II-ÉCOLOGIE DE <i>BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM</i>	p. 24
<u>A-INTRODUCTION</u>	
<u>B-GENERALITES</u>	
<u>C-IMPLANTATION CHEZ L'HOMME</u>	p. 26
1-ÉTABLISSEMENT DE LA FLORE BIFIDE CHEZ LE NOUVEAU-NE	
a-Mode de naissance	
b-Alimentation	p. 27
c-Individualité et environnement	
2-EVOLUTION CHEZ L'HOMME	p. 29
3-ROLE DE LA FLORE BIFIDE	
FACTEURS BIFIDIGENES	p. 32
I-MODIFICATION DE LA COMPOSITION DU LAIT DE VACHE	p. 33
<u>A-GENERALITES</u>	
<u>B-LE LACTOSE ET SES DERIVES</u>	
<u>C-AUTRES CONSTITUANTS</u>	p. 34
1-LES PROTEINES ET LES SELS	
2-LES ACIDES GRAS	
II-IDENTIFICATION DE FACTEURS BIFIDIGENES	
<u>A-DEFINITION</u>	
<u>B-LE LACTULOSE</u>	p. 35
<u>C-LE BIFIDUS FACTEUR 1 DE GYORGY</u>	p. 36
1-MISE EN EVIDENCE	
2-RELATION STRUCTURE-ACTIVITE	p. 37
<u>D-LE FACTEUR DE RAYNAUD</u>	p. 41
<u>E-CONSTITUANTS DIVERS</u>	
1-GLYCOPROTEINES ET GLYCOPEPTIDES	
2-PANTHETHEINE ET JUS DE CAROTTE	p. 43
3-OLIGOSACCHARIDES ET GLYCOPROTEINES PRODUITS PAR D'AUTRES BACTERIES	
III-CONCLUSIONS	p. 44

MATERIEL ET METHODES

p. 45

I-TECHNIQUES MICROBIOLOGIQUES

A-SOUCHE UTILISEE

B-TECHNIQUES DE CULTURE

1-ISOLEMENT DE LA SOUCHE

2-MILIEU POUR LA FERMENTATION DE SUCRES

3-CULTURE EN FLACON DE PENICILLINE

p. 46

4-CULTURE EN FERMENTEUR

p. 47

C-MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

II-TECHNIQUES D'EXTRACTION DES ACTIVITES

ENZYMATIQUES

p. 49

A-CONSERVATION DES CELLULES

B-EXTRACTION AUX ULTRA-SONS

C-EXTRACTION A LA PRESSE DE FRENCH

P. 50

D-EXTRACTION DES ACTIVITES PAR LA PROMASE ET LE LYSOZYME

E-EXTRACTION DES ACTIVITES AU BUTANOL

P. 51

III-TECHNIQUES D'ANALYSES

A-BIOMASSE BACTERIENNE

B-DETECTION DES ACTIVITES ENZYMATIQUES SUR GALERIE API-ZYM

C-MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE FRUCTOSE-6-PHOSPHATE

PHOSPHOCETOLASE

P. 52

D-DOSAGE DES PROTEINES

E-MESURE DES ACTIVITES GLYCOSIDASQUES

1-MISE EN EVIDENCE DES ACTIVITES SUR pNP-OSIDES

a-Principe

p. 53

b-Mode opératoire

2-MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE α -D-NEURAMINIDASIQUE

a-Principe

b-Mode opératoire

p. 54

3-MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE α -L-FUCOSIDASIQUE

a-Principe

b-Mode opératoire

IV-TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES	p. 55
<u>A-CHROMATOGRAPHIE DE GEL FILTRATION SUR COLONNE DE SUPEROSE 6</u> <u>ET SUR COLONNE DE SEPHAROSE CL 6B</u>	
<u>B-CHROMATOGRAPHIE SUR HYDROXYLAPATITE ULTROGEL</u>	
<u>C-CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS SUR MONO Q</u>	p. 56
<u>D-CHROMATOGRAPHIE HYDROPHOBE SUR OCTYL SEPHAROSE</u>	
V-ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE	p. 57
<u>A-ELECTROPHORESE EN CONDITIONS DENATURANTES</u>	
<u>B-ELECTROPHORESE EN CONDITIONS NON DENATURANTES</u>	
<u>C-TRANSFERT DES PROTEINES ET REVELATION DES PROTEINES APRES</u> <u>TRANSFERT</u>	
VI-ETUDE DES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES	p. 58
<u>A-DETERMINATION DES MASSES MOLECULAIRES PAR CHROMATOGRAPHIE DE</u> <u>TAMISAGE MOLECULAIRE</u>	
<u>B-DETERMINATION DU POINT ISOELECTRIQUE PAR CHROMATOFOCALISATION</u>	
VII -ETUDE DES PROPRIETES ENZYMATIQUES	p. 59
<u>A-DETERMINATION DU PH OPTIMAL</u>	
<i>1-SOLUTION STOCK DE TAMPON CITRATE BORATE</i>	
<i>2-TAMPON CITRATE PHOSPHATE BORATE 0,1 M</i>	
<u>B-DETERMINATION DE LA TEMPERATURE OPTIMALE</u>	
<u>C-STABILITE A LA TEMPERATURE</u>	P. 60
<u>D-DETERMINATION DU K_m ET DU V_{max}</u>	
<u>E-DETERMINATION DU K_v VIS-A-VIS DE L'ACIDE SIALIQUE</u>	
VIII-ACTIONS D'EFFECTEURS SUR L'ACTIVITE α -D- NEURAMINIDASIQUE	
RESULTATS	
I-CARACTERISTIQUES DE LA SOUCHE <i>BIFIDOBACTERIUM</i> <i>BIFIDUM AA/22</i>	p. 62

<u>A-DETERMINATION DU GENRE BACTERIEN</u>	
1-PRINCIPALES CARACTERISTIQUES	
2-OBSERVATIONS MICROSCOPIQUES	
3-CONCLUSION	
<u>B-CARACTERISATION DE L'ESPECE</u>	
1-DETERMINATION DE L'ESPECE	
2-COMPARAISON AVEC LA SOUCHE TYPE	p. 66
a-Galerie Api 50 CH	
b-Activités enzymatiques	p. 69
II-OPTIMISATION DE LA PRODUCTION D'ENZYMES	p. 72
<u>A-INTRODUCTION</u>	
<u>B-DETERMINATION D'UN pH OPTIMUM</u>	p. 75
1-INFLUENCE DU pH SUR LA PRODUCTION DE BIOMASSE	
2-INFLUENCE DU pH SUR LA PRODUCTION D'ENZYMES	p. 77
a-Influence du pH sur les activités glycosidasiques exocellulaires	
b-Influence du pH sur les activités cellulaires	
3-CONCLUSION	p. 80
<u>C-DETERMINATION D'UN MILIEU MINIMUM</u>	
1-PRODUCTION DE BIOMASSE	p. 81
2-PRODUCTION D'ENZYMES	
3-CONCLUSION	
<u>D-INFLUENCE DES FACTEURS BIFIDIGENES</u>	
1-INFLUENCE DES FACTEURS BIFIDIGENES SUR LA BIOMASSE	p. 83
2-INFLUENCE DES FACTEURS BIFIDIGENES SUR LA PRODUCTION D'ENZYMES	p. 85
3-CONCLUSION	p. 87
<u>E-PRODUCTION DE GLYCOSIDASES EN FERMENTEUR</u>	p. 88
1-CINETIQUE DE LA FERMENTATION	
2-INFLUENCE DES CONDITIONS DE CULTURE EN FERMENTEUR SUR LA PRODUCTION DE GLYCOSIDASES	
a-Influence du glucose	
b-Influence des facteurs bifidigènes	p. 92
c-Conclusion	p. 94
<u>F-CONSERVATION DES CELLULES</u>	

III-EXTRACTION DES ACTIVITES ENZYMATIQUES	p. 96
<u>A-ETUDE DES DIFFERENTS MOYENS D'EXTRACTION</u>	
1-RESULTATS	
2-CONCLUSION	p. 100
<u>B-OPTIMISATION DE L'EXTRACTION AUX ULTRA-SONS DES ACTIVITES ENZYMATIQUES</u>	p. 102
1-MILIEU D'EXTRACTION	
a-Effets des détergents sur les activités enzymatiques	
b-Extraction en présence d'additifs	p. 104
c-Concentration optimale en Nonidet P 40	
d-Concentration optimale en EDTA	p. 107
e-Analyse par gel filtration des fractions extraites aux ultra-sons	
2-INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN MATIERE SECHE	p. 109
3-INFLUENCE DU TEMPS DE SONAGE SUR L'EXTRACTION DES ACTIVITES GLYCOSIDASIQUES	
a-Cinétique d'extraction	
b-Analyse des fractions enzymatiques obtenues	p. 113
<u>C-CONCLUSION</u>	
IV-PURIFICATION ET CARACTERISATION DE L'ACTIVITE NEURAMINIDASIQUE	p. 117
<u>A-PURIFICATION DE LA NEURAMINIDASE I DE BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM AA/22</u>	
1-CHROMATOGRAPHIE D'ADSORPTION SUR HYDROXYLAPATITE-ULTROGEL	
2-CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS SUR MONO Q HR 5/5	p. 119
3-CHROMATOGRAPHIE D'INTERACTION HYDROPHOBE SUR OCTYL SEPHAROSE	
4-CONCLUSION	p. 124
<u>B-CARACTERISTIQUES DE LA NEURAMINIDASE I DE BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM AA/22</u>	
1-PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES	
a-Masse moléculaire	
b-Point iso-électrique	
2-PROPRIETES ENZYMATIQUES	p. 126
a-Température optimale et stabilité à la température	
b-pH optimal d'action	
c-Détermination du K_M et du V_M sur Nu-NeuAc	p. 131
d-Inhibition par l'acide sialique	

e-Spécificité de la neuraminidase vis-à-vis de la liaison

C-CONCLUSION

CONCLUSION GENERALE

p. 136

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

L'alimentation des nourrissons au lait de Femme a toujours été reconnue comme bénéfique pour l'état de santé de l'enfant. Les études nombreuses (FEACHEM, 1984, DUFFY, 1986, BUTZ, 1984) démontrent maintenant son influence sur la diminution du taux de mortalité infantile en diminuant la fréquence des diarrhées infectieuses.

Parallèlement, mais aussi beaucoup plus récemment, les études concernant la flore digestive du nourrisson allaité au sein ont permis de caractériser des quantités importantes de Bifidobactéries. La souche prédominante dans ce cas est le *Bifidobacterium bifidum*. La colonisation de l'intestin s'effectue alors au détriment de certaines bactéries pathogènes ou putréfiantes. Il devenait alors logique d'essayer d'établir une corrélation entre l'établissement de cette flore particulière et l'état de santé du nourrisson.

La disparition de *B. bifidum* des selles de nourrisson au moment du sevrage ou lors d'une alimentation mixte a suscité un grand nombre de travaux concernant l'existence de facteurs de croissance particuliers dans le lait humain. Les travaux réalisés *in vitro* ont montré que certains oligosaccharides du lait de Femme pouvaient être considérés comme facteur bifidigène de croissance (MONTREUIL, 1957, BULLEN, 1977, SEKA ASSY, 1982, NEUT *et al.*, 1984). Dans le cas particulier de *B. bifidum*, la croissance dépend essentiellement de la présence ou non de N-acétylglucosamine. Ce monosaccharide se trouve en position interne dans les oligosaccharides. Sa mise à disposition ne peut se concevoir qu'après une hydrolyse enzymatique des structures glucidiques. A partir de cette constatation, il a été émis l'hypothèse suivante : le *B. bifidum* doit posséder un équipement glycosidasique important, différent des autres microorganismes, en vue de la dégradation des oligosaccharides du lait.

Ces activités enzymatiques doivent en outre jouer un rôle au niveau des mucines intestinales (apparition ou disparition de sites lectiniques pour les interactions bactériennes).

L'étude des glycosidases était donc intéressante à deux points de vue :

- outil pour l'étude structurale des copules polysaccharidiques
- moyen d'appréhender les réactions biologiques qui peuvent se dérouler au niveau de l'écosystème bactérien de l'intestin.

Après avoir présenté les principales connaissances concernant les Bifidobactéries et les facteurs bifidigènes, nous exposerons les résultats obtenus concernant :

- l'optimisation de la production de glycosidases chez une souche de *B. bifidum* isolé de l'intestin du nourrisson
- l'étude des propriétés physico-chimiques et enzymatiques d'une α -D-neuraminidase isolée et purifiée au cours de ce travail.

GENERALITES

BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM

Les Bifidobactéries furent décrites pour la première fois par TISSIER en 1900, qui les répertoria sous le nom de *Bacillus bifidus communis* ou plus simplement de *Bacillus bifidus*. Ces microorganismes gram positif, anaérobies, étaient décrits comme des bâtonnets recourbés, parfois bifides. Ils constituaient la flore fécale dominante des nourrissons nourris au lait maternel. C'est sur ce point qu'apparurent aussitôt les premiers problèmes quant à la classification et à l'identification de ce genre. En effet MORO, en 1900, isola un microorganisme gram positif, anaérobie facultatif sous forme de bâtonnet non courbé et non bifide qu'il dénomma *Bacillus acidophilus*. Ce microorganisme prédominant dans les fécès d'enfants nourris au lait de Femme était morphologiquement différent de celui isolé par TISSIER. Durant une soixantaine d'années les travaux ont surtout porté sur les observations cliniques de l'influence de cette flore sur l'état de santé du nourrisson et, en particulier, sur leur résistance aux infections. On a en même temps essayé de caractériser les facteurs de croissance de ces microorganismes.

S'il fut facilement démontré que le lait maternel contenait les facteurs bifidigènes, les essais de supplémentation du lait de Vache n'obtinrent pas les résultats escomptés quant au développement de la flore intestinale bifide. Contrairement à ce que pensait TISSIER, il est apparu que les Bifidobactéries n'étaient pas uniquement présentes dans la flore intestinale du nourrisson mais qu'on les retrouvait aussi dans celle d'enfants nourris au biberon et chez l'adulte. Dans ce cas, elles ne constituent que 40 p.100 de la flore fécale totale et diminuent ensuite avec l'âge. L'importance des Bifidobactéries a été surestimée quant à leur action sur la santé et la nutrition des enfants. L'effet qui leur est attribué le plus généralement est la résistance aux gastro-entérites, due à la suppression de la flore putréfiante. On négligeait, en fait, les problèmes de contamination microbienne de l'alimentation au biberon et les

lacunes en ce qui concerne la composition des laits de remplacement.

Durant cette période, les incertitudes quant à la classification de ces microorganismes restaient toujours d'actualité. On les classa surtout sous le terme de *Lactobacillus acidophilus* (WEISS et RETTGER, 1934, 1938). Ces difficultés venaient surtout de l'inadaptation des milieux d'isolement et de culture.

L'étude plus systématique des bactéries du genre *Bifidobacterium* a été ensuite entreprise, tant au niveau classification (étude des caractéristiques biochimiques, physiologiques, morphologiques et génétiques) qu'au niveau de l'écologie et des facteurs bifidigènes.

C'est en 1957 que DEHNERT a établi une première classification en cinq groupes en fonction de la fermentation des glucides. REUTER la compléta en 1963 en y incluant les espèces du tractus digestif humain. Il apparut ensuite que les Bifidobactéries se retrouvaient chez des hôtes plus variés comme les Mammifères ou les Insectes (MITSUOKA, 1969; SCARDOVI et al., 1969; SCARDOVI et TROVATELLI, 1969). En 1974, les Bifidobactéries étaient reconnues comme genre à part entière dans le Bergey's Manual (BUCHANAN et GIBBONS, 1974), dont la dernière édition (SCARDOVI, 1986) dénombre 24 espèces différentes.

I-BIOLOGIE DE *BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM*

A-INTRODUCTION

La biologie des Bifidobactéries repose classiquement sur l'étude de leur morphologie, de leurs caractères physiologiques et biochimiques, ainsi que de leurs caractéristiques génétiques.

Nous essaierons dans un premier temps de faire apparaître les éléments les plus caractéristiques de ce genre bactérien et ensuite de souligner les critères qui déterminent la différenciation des espèces.

B-CARACTERISTIQUES DU GENRE BIFIDOBACTERIUM

1-MORPHOLOGIE :

a-Historique :

C'est cette caractéristique qui attira l'attention de TISSIER (1900) et lui permit de décrire le premier ce microorganisme, sous forme de bâtonnet recourbé ou de bâtonnet présentant une extrémité divisée en Y, ce qui lui donna son nom. Mais on rencontrait dans les mêmes cultures des formes plus ou moins bulbeuses et plus ou moins ramifiées.

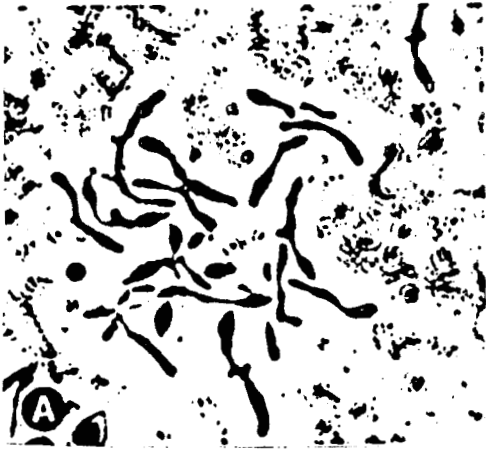
De nombreux auteurs observèrent ces formes mais celles-ci variaient en fonction du milieu de culture, et pour une même culture en fonction de son âge. Ce pléomorphisme provoqua dans un premier temps une polémique sur l'originalité de la découverte de TISSIER, puis souleva ensuite de nombreuses difficultés quant à l'isolement, l'étude et la classification de ce genre bactérien.

Seule l'utilisation de milieux sélectifs, dont le premier fut celui de NORRIS *et al.* (1950), a permis une étude systématique de la morphologie. Une comparaison des formes des différentes espèces cultivées en milieu anaérobie dans un milieu trypticase - peptone - extrait de levure (TPY) montre que certaines espèces ont des formes caractéristiques qui peuvent éventuellement être utilisées comme critère de classification (Figure 1; p.6).

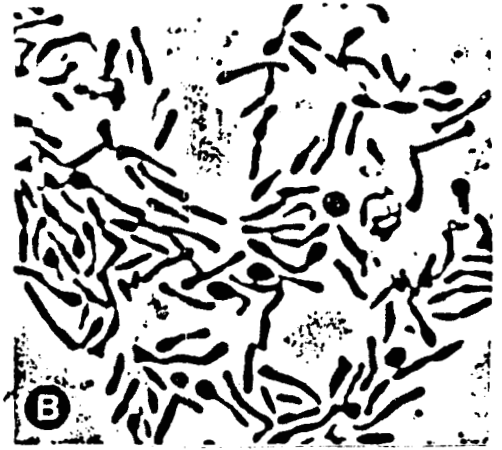
b-Pléomorphisme et forme bifide :

POUPARD *et al.* (1973) retracent dans une revue générale l'historique de l'étude morphologique des Bifidobactéries et des variations de cette morphologie en fonction des conditions de culture. On peut cependant souligner que dans un isolement frais du microorganisme on rencontre des formes bifides en Y ou en V, ainsi que des formes courbes en spatule ou en massue. Par contre, dans des subcultures les bâtonnets plus ou moins recourbés sont prédominants, mais présentent des irrégularités qui leur confèrent des formes branchées. Enfin, dans des conditions de culture défavorables, le pléomorphisme se rencontre systématiquement.

GLICK *et al.* en 1960 ont été les premiers à étudier les causes de ce pléomorphisme chez *Bifidobacterium bifidum* var. *pennsylvanicus*. Ils ont observé dans des milieux déficitaires en glucides N-acétylaminés



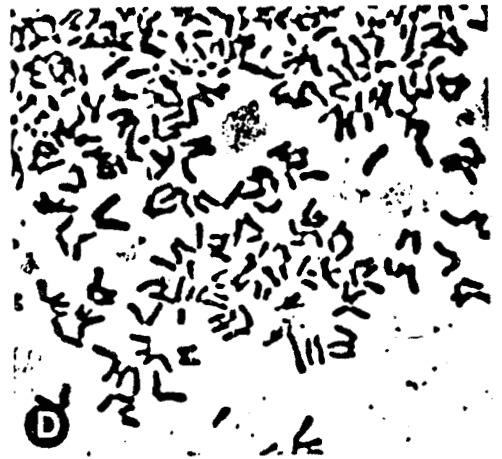
B. bifidum



B. longum



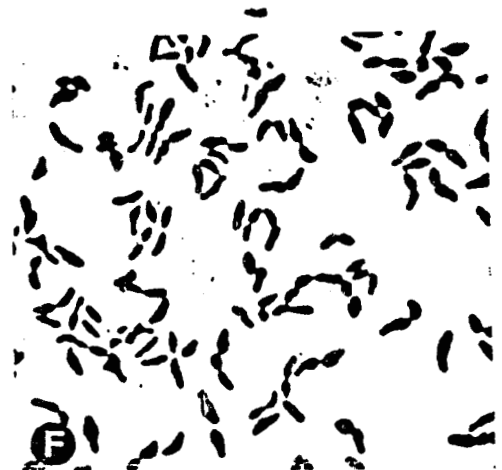
B. breve



B. angulatum



B. catenulatum



B. globosum

Figure 1 : DIFFERENTES MORPHOLOGIES DANS LE GENRE BIFIDOBACTERIUM
CELLULES CULTIVEES SUR AGAR TPY (x 1500)

l'apparition de formes bulbeuses. Ces glucides interviennent dans la formation des peptidoglycannes, constituants de la paroi cellulaire. Mais ces mêmes auteurs ont constaté qu'un taux élevé de glucides N-acétylaminés provoque une disparition des formes bifides.

Les sels également interviennent dans l'apparition des formes bifides. KOJIMA et al. en 1968 constatèrent que le sulfate et l'acétate de sodium ainsi que les chlorures d'autres ions monovalents induisent la forme bifide. En 1970, les mêmes auteurs montrèrent que la teneur en ion calcium (Ca^{2+}) des cellules et des parois est plus faible pour la forme bifide que pour les formes bacillaires; de plus, l'addition de chélatant ou de $CaCl_2$ fait varier la nature des formes observées.

D'autres auteurs ont observé l'influence des acides aminés sur ce pléomorphisme. HUSAIN et al. en 1972 montrèrent que *Lactobacillus bifidum* cultivé sur un milieu minimum présente essentiellement des formes bifides, et que l'addition d'alanine, d'acide aspartique et d'acide glutamique induit la réapparition des formes en bâtonnet. D'autres auteurs (CUMMINS et al., 1957; VEERKAMP et al., 1965) avaient souligné précédemment la présence de ces acides aminés dans la paroi des Bifidobactéries, sans pour autant pouvoir prouver qu'il existait des différences de concentration en ces amino-acides entre la forme bifide et la forme bacillaire.

En conclusion, on peut citer POUPARD et coll. (1973) qui, en combinant différents milieux de culture, arrivèrent à maintenir différentes souches dans une morphologie prédéterminée en utilisant des milieux adaptés. Ils émirent donc l'hypothèse que la forme branchée ne serait pas une dégénérescence de la forme bifide, mais plutôt une forme d'adaptation à un environnement nutritionnel non optimal.

c-Ultrastructure :

Peu de travaux ont été réalisés jusqu'à présent sur ce sujet. OVERMAN et PINE (1963) ont été les premiers à s'y intéresser. Plus récemment, ZANI et SEVERI (1982) ont confirmé l'existence du pléomorphisme, mais leur observation plus détaillée a permis de mettre en évidence différents types de structures membranaires, les unes caractéristiques de mésosomes, les autres d'un type inconnu. L'existence de ces dernières n'ayant pas été observée chez la souche *Bifidobacterium bifidum* de TISSIER, ces auteurs attribuent l'origine de ces structures à une évolution de la souche de *Bifidobacterium bifidum* S 28 (ATCC 696).

Cependant, à l'heure actuelle peu d'études comparatives par microscopie électronique des différentes formes, voire des différentes espèces, ont été entreprises (BAUER et al., 1975). Il semble délicat de tirer des conclusions sur les relations entre l'ultrastructure de ces microorganismes et la morphologie; le passage d'une phase bâtonnet à une phase bifide n'est pas contrôlé.

2-CARACTERISTIQUES PHYSIOLOGIQUES

a-Anaérobiose :

Les Bifidobactéries sont généralement considérées comme des organismes anaérobies, mais certaines souches ou certaines espèces sont plus ou moins sensibles à l'oxygène, et sont dans ce cas tolérantes vis-à-vis de celui-ci, mais ce toujours en présence de CO₂. Deux explications ont été avancées pour expliquer cette particularité:

- Les Bifidobactéries sont plus ou moins sensibles à l'H₂O₂ qui est un inhibiteur de la fructose-6-phosphate phosphocétolase, enzyme clef du métabolisme des glucides (DE VRIES et STOUTHAMER, 1969). Cette sensibilité dépend soit de l'activité de la catalase qui élimine les traces de H₂O₂ présentes, soit de la NADH oxydase dont l'action dans certains cas n'induit pas la formation de H₂O₂.
- Les Bifidobactéries sont plus ou moins sensibles au potentiel d'oxydo-réduction. RASIC et KURMANN en 1983 ont mis en évidence des souches très sensibles à l'oxygène et qui ne dégradent le glucose qu'en milieu réducteur bien que l'oxygène ne soit pas létal pour ces souches. Dans ce dernier cas, l'oxygène bloquerait la croissance en augmentant le potentiel d'oxydo-réduction.

b-Température et pH :

La majorité des Bifidobactéries d'origine humaine ont une croissance optimale à des températures comprises entre 37 et 41°C. Pour des températures inférieures à 25°C ou supérieures à 45°C, il n'y a pas de croissance. Par contre, les souches d'origine animales ont généralement des températures optimales de croissance plus élevées et se développent encore à 46°C (RASIC et KURMANN, 1983; BUCHANAN et al., 1974).

Le pH optimum de croissance est compris entre 6 et 7. Pour des valeurs inférieures à 5 ou supérieures à 8, la croissance est inhibée (BUCHANAN et al., 1974; SCARDOVI, 1986).

3-BESOINS NUTRITIONNELS

A ce niveau les Bifidobactéries forment un groupe très hétérogène, sans que l'on puisse même établir une corrélation avec leur origine écologique.

a-Nutrition azotée :

La plupart des Bifidobactéries sont capables d'utiliser les sels d'ammonium comme seule source d'azote (HASSINEN et al., 1951). Seules *B. suis*, *B. magnum*, *B. choerinum* et *B. arnili* ont besoin d'azote organique.

Dans ces conditions, les Bifidobactéries excrètent des quantités importantes d'acides aminés : alanine, valine et acide aspartique en majorité (MATTEUZZI et al., 1978). *B. bifidum* peut excréter jusqu'à 150 mg/l de thréonine (SCARDOVI, 1986).

b-Nutrition minérale :

La nutrition minérale a surtout été étudiée chez *Bifidobacterium bifidum*, qui a besoin de Fer (Fe^{2+} et Fe^{3+}), Zinc (Zn^{2+}), Cuivre (Cu^{2+}), Manganèse (Mn^{2+}) et Magnésium (Mg^{2+}) pour sa croissance.

Du fait de l'importance du Fer dans la nutrition du nouveau-né on a essayé de connaître les mécanismes d'assimilation des ions ferriques (Fe^{3+}) et ferreux (Fe^{2+}). Le Fer ferrique est assimilé à pH neutre (BEZKOROVAINY et al., 1986 ; UEDA et al., 1983), le Fer ferreux à pH acide (TOPOUZIAN, 1986) et son transport sous forme libre (Fe^{2+}) dépendrait d'une ATPase membranaire et non de la présence d'un transporteur d'ion très spécifique qui entrerait en compétition avec la transferrine et la lactotransferrine.

Le Fer a également un rôle dans la protection intestinale de l'enfant vis-à-vis des infections bactériennes. Il pourrait intervenir à deux niveaux. Premièrement, en maintenant l'acidité inhibitrice du développement des bactéries putréfiantes, la production d'acide chez les Bifidobactéries étant en effet fonction de la concentration en Fer du milieu (BEZKOROVAINY et TOPOUZIAN, 1983). Deuxièmement, la virulence des

bactéries dépend souvent des disponibilités en Fer (FINKELSTEIN et al., 1983) et chez l'enfant nourri au lait maternel le pH des selles est voisin de 5, pH auquel le Fer est sous forme ferreux Fe^{2+} et peut être piégé par les Bifidobactéries, ce qui entraînerait une déplétion en Fer.

c-Besoins vitaminiques :

Il n'y a pas d'exigences communes pour les différents genres, ni pour les différentes espèces. De plus, ces exigences ne dépendent pas des différentes localisations écologiques.

DEGUCHI et al. (1985) ont montré que certaines espèces sont capables de libérer dans le milieu des vitamines, en particulier thiamine, acide nicotinique et acide folique.

d-Facteurs bifidigènes :

Si l'importance du sujet justifie une étude détaillée ultérieure, ces facteurs interviennent parfois dans la classification.

ROMOND et coll. (1980) ont envisagé l'étude des exigences nutritives des Bifidobactéries isolées fraîchement. Ils ne mettent en évidence que des composés complexes (lait, extraits de foie) qui permettent d'effectuer une différenciation au sein du genre.

4-METABOLISME DES SUCRES

a-Introduction :

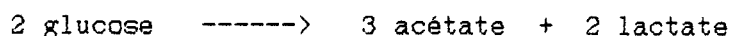
Les Lactobacilles fermentent le glucose par la voie d'EMBDEN MEYERHOFF ou par le shunt des hexoses monophosphates. Les Bifidobactéries utilisent le glucose par la voie de l'hexose-phosphocétolase. Celle-ci est encore appelée "shunt du fructose-6-phosphate", elle est caractéristique du genre *Bifidobacterium* (SCARDOVI et TROVATELLI, 1965; DE VRIES et al., 1967; VEERKAMP, 1969).

b-Le shunt de la fructose-6-phosphate phosphocétolase ou "shunt bifid" :

Cette voie (Figure 2; p.12) est caractérisée par la présence de la fructose-6-phosphate phosphocétolase, de la transaldolase et de la trans-cétolase, ces deux dernières enzymes catalysant une réaction inverse de celle observée dans la voie des hexoses monophosphates (shunt des hexoses monophosphates, voie des pentoses).

Le glycéraldéhyde-3-phosphate conduit ensuite au pyruvate par des enzymes similaires à celles rencontrées dans la voie d'EMBDEN MEYERHOFF.

Chez *Bifidobacterium bifidum* la transformation du pyruvate en lactate se fait par l'intermédiaire de la lactate déshydrogénase. Le bilan de cette voie est :



D'un point de vue énergétique il y a formation de 2,5 moles d'ATP par mole de glucose consommée, alors que pour la fermentation homofermentaire et hétérofermentaire elle n'est respectivement que de 2 et 1.

Cependant, on remarque que la plupart des souches de Bifidobactéries produisent plus d'acide acétique et moins d'acide lactique que ne le laisse supposer cette voie de dégradation. Ce phénomène se rencontre essentiellement dans des cultures en phase exponentielle de croissance. Cette variation est attribuée à la fois à la décarboxylation du pyruvate en acide acétique et acide formique par l'intermédiaire de la voie phosphothioclastique, et à la réduction de l'acétyl, provenant de la décarboxylation du pyruvate, en éthanol (DE VRIES et STOUTHAMER, 1968; LAUER et KANDLER, 1976).

L'utilisation du shunt s'explique par l'absence d'enzymes clés. La glucose-6-phosphodéshydrogénase et l'aldolase n'ont pas été détectées chez les Bifidobactéries par DE VRIES et STOUTHAMER en 1967, ce qui excluerait un métabolisme empruntant la voie de la glycolyse ou celle de l'hexose monophosphate, SCARDOVI et SGORBATI en 1974 ont caractérisé une très faible réactivité de ces enzymes chez certaines espèces.

c-Decarboxylation du pyruvate :

On rencontre en anaérobiose trois types de réaction de transformation du pyruvate en acétyl-Co A : la réaction phosphoclastique, la réaction thioclastique et la voie de la pyruvate décarboxylase.

La réaction thioclastique chez les Bifidobactéries est catalysée

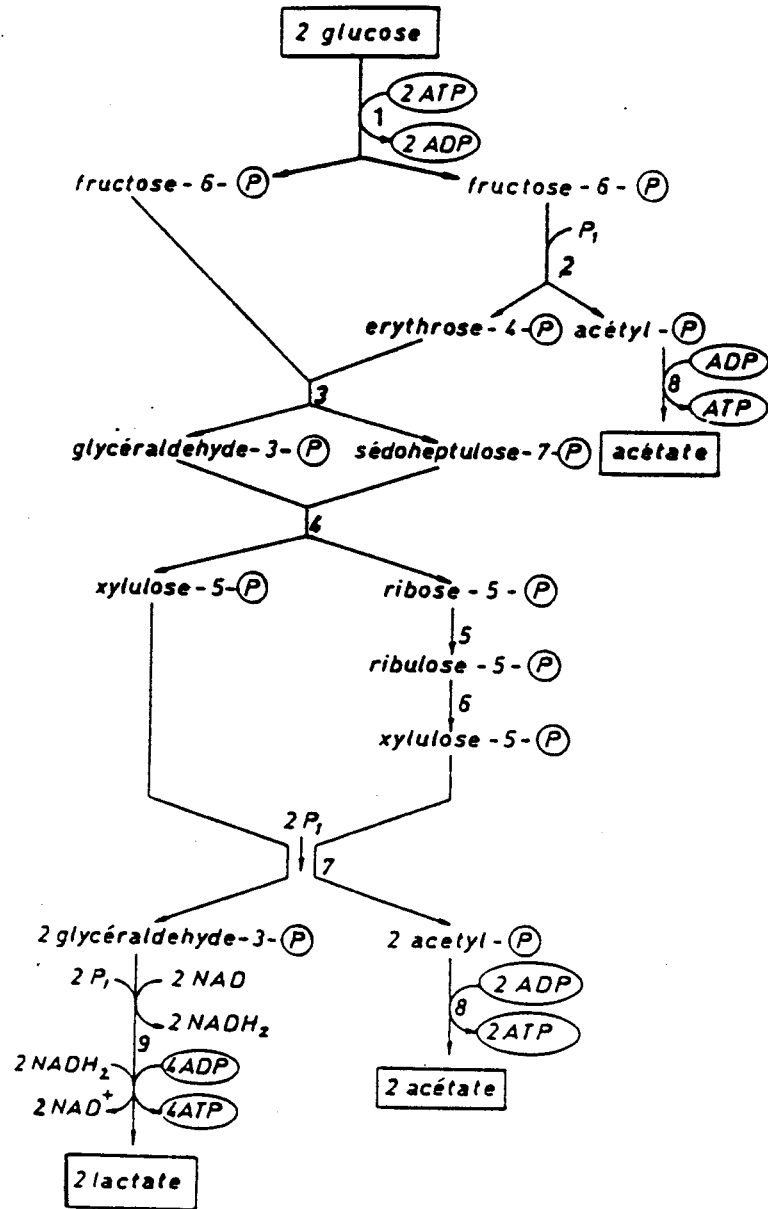


FIGURE 2: DEGRADATION DES HEXOSES PAR LA VOIE DU FRUCTOSE-6-PHOSPHATE PHOSPHOCETOLASE

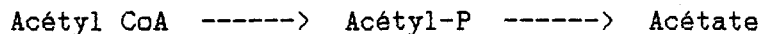
- Enzymes: 1 : hexokinase et glucose-6-phosphate isomérase
2 : fructose-6-phosphate phosphocétolase
3 : transaldolase
4 : transcétolase
5 : ribose-5-phosphate isomérase
6 : ribulose-5-phosphate 3-épimérase
7 : xylulose-5-phosphate phosphocétolase
8 : acétate kinase
9 : enzymes de la voie homofermentaire

par la pyruvate formiate lyase. La réaction est irréversible et l'enzyme active n'est pas très stable. Un mécanisme d'activation a été proposé par GOTTSHALK en 1979. Ce mécanisme nécessite quatre composés : le FADH₂, une enzyme d'activation, la S-adénosylméthionine et le pyruvate.

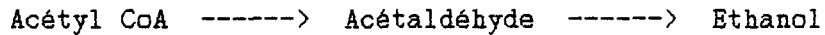
Le formiate est rejeté tel quel dans le milieu ou oxydé par la formiate déshydrogénase. Dans ce cas les électrons produits, via une chaîne de transporteurs, servent à la réduction des protons par une hydrogénase. Cependant, la nature de ces transporteurs reste inconnue.

d-Formation de l'acétate et de l'éthanol :

L'acétate est formé à partir de l'acétyl-CoA provenant de la décarboxylation du pyruvate par l'utilisation d'une acétate kinase (EC 2.7.2.1). Il y a libération d'une mole d'ATP par mole d'acétate formée.



L'éthanol est formé lui aussi à partir de l'acétyl-CoA



e-Conclusion :

La présence de la fructose-6-phosphate-phospho-cétolase et la dégradation du glucose par l'intermédiaire de cette enzyme est une caractéristique essentielle du genre *Bifidobacterium*. On constate cependant qu'il existe des variations dans les produits de fermentation entre les espèces et même au sein d'une même espèce (DE VRIES et STOUTHAMER, 1968; Tableau I; p.14) en fonction du milieu de culture et de l'âge de la culture.

On peut noter une particularité des Bifidobactéries en ce qui concerne le métabolisme du galactose. Alors que chez la plupart des microorganismes, les enzymes de la voie de LENOIR sont induites par le galactose ou le fucose, chez les Bifidobactéries elles sont constitutives (LEE et al., 1980).

5-CONCLUSIONS

Si historiquement le genre *Bifidobacterium* a été successivement assimilé aux genres *Bacillus*, *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Actinomyces*, nous pouvons cependant donner en conclusion les principales caractéristi-

**TABEAU I : VARIATION DES PRODUITS DE FERMENTATION DE DIFFERENTES SOUCHES
DE *B. bifidum* EN FONCTION DES SUCRES UTILISES COMME SUBSTRATS
(DE VRIES - 1968).**

Souches	Substrats	Produits de fermentation			
		Acétate	Lactate	Ethanol	Formiate
S. 324	Glucose	1,85	0,21	0,27	0,66
	Lactose	3,10	1,54	0,04	0,07
	Galactose	1,82	0,30	0,26	0,52
	Mannitol	1,35	0,33	0,62	0,55
S. 200	Glucose	1,87	0,24	0,14	0,62
	Lactose	3,50	1,11	0,14	0,56
	Mannitol	1,40	0,05	0,64	0,77
	Xylose	1,58	0,09	0,38	0,66
S. 128	Glucose	1,52	0,62	0,10	0,21
	Xylose	1,23	0,40	0,18	0,48
S. 327	Glucose	2,04	0	0,33	0,52
	Lactose	3,15	0,63	0,38	0,79
S. 337	Glucose	1,50	0,35	0,26	0,38
S. 332	Mannitol	1,39	0,15	0,69	0,50

Les valeurs sont données en moles de produits libérés par mole de substrat hydrolysé.

ques de ce genre bactérien :

- Du point de vue morphologique, les Bifidobactéries sont des bacilles. Ils présentent un polymorphisme et un pléomorphisme en fonction des conditions de culture. Les essais d'identification prenant en compte la forme de la colonie et l'observation microscopique arrivent difficilement à différencier le genre *Bifidobacterium*.

- Ce sont des bacilles gram +, anaérobies.

- Le métabolisme des glucides permet d'utiliser deux critères d'identification précis :

* d'une part la présence de la fructose-6-phosphate phosphocétolase dont la mise en évidence est possible (SCARDOVI, 1986).

* d'autre part le dosage des acides gras volatils (trois moles d'acide acétique pour deux moles d'acide lactique, un peu d'acide formique et d'éthanol).

Il est donc maintenant possible d'identifier parfaitement ce nouveau genre, et de bien le différencier des genres voisins (Tableau II; p. 16). Cette identification peut être de plus confirmée par le séquençage du RNA 16 S. Par cette méthode, STACKEBRANDT et WOESE en 1980 ont montré que l'on pouvait différencier nettement *Bifidobacterium* de *Lactobacillus*.

L'ensemble des caractéristiques que nous venons de présenter permet donc de ne plus confondre le genre *Bifidobacterium* des genres auxquels on le rattachait jusque là.

C-DETERMINATION DE L'ESPECE

1-INTRODUCTION

La définition des espèces bactériennes dépend des critères pris en compte pour la classification mais également des méthodologies utilisées.

Si l'on a souvent utilisé des critères biochimiques reposant essentiellement sur la fermentation des sucres pour la classification des Bifidobactéries, on voit de plus en plus se développer des techniques plus modernes comme l'hybridation ADN-ADN ou la caractérisation de certains composés cellulaires : constituants de la paroi et protéines, ou encore

TABEAU II : CARACTERISTIQUES DES GENRES VOISINS DE BIFIDOBACTERIUM

	BIFIDOBACTERIUM	ACTINOMYCES	LACTOBACILLUS	PROPIONIBACTERIUM	EUBACTERIUM
Morphologie	bâtonnets très irréguliers	bâtonnets souvent branchus colonnies en filaments	bâtonnets	bâtonnets irréguliers	bâtonnets
Coloration gram	+	+	+	+	+
Type respiratoire	anaérobie strict	anaérobie facultatif	variable	anaérobie facultatif anaérobie strict	anaérobie strict
∅ G + C	55 à 67	57 à 69		53 à 68	30 à 55
Composition de la paroi Diamino-acide	Lys-Orn	Lys-Orn		LL-DAP-meso DAP	
Formation de gaz sur glucose	-	-	V	-	V
Produits de fermentation	A - L	S	L	P	B - A - F rien
Production de catalase	-	V	+ (-)	-	-
Réduction des Nitrates	-	+ (-)	+ (-)	V	-
Production d'indole	-	-	V	-	-
Liquéfaction de la gélatine	-	- (+)	+ (-)	V	-
Acidification des milieux contenant du :					
Rhamnose	-	V	- (+)	- (+)	V
Sorbose	-	V	V	- (+)	- (+)
Glycerol	-	-	+ (-)	- (+)	- (+)
Erythritol	-	-	+ (-)	- (+)	- (+)
Adonitol	-	-	V	- (+)	- (+)
Dulcitol	-	-	- (+)	- (+)	- (+)

V : variable
A : acide acétique
L : acide lactique

+ (-) : majorité des souches +
B : acide butyrique
P : acide propionique

- (+) : majorité des souches -
F : acide formique
S : acide succinique

l'utilisation de critères immunologiques.

2-DEGRADATION DES SUCRES

DEHNERT en 1957 a le premier mis en évidence cinq groupes de Bifidobactéries en utilisant les critères de fermentation des sucres. Mais c'est surtout MITSUOKA en 1974 qui réalisa une étude plus complète à partir de 480 souches (Tableau III; p.18). L'utilisation des critères de fermentation des glucides et de croissance des souches à 46,5 °C lui a permis de bien différencier les souches d'origine humaine de celles d'origine animale. On peut cependant souligner que toutes les Bifidobactéries fermentent plus ou moins vite le glucose, le galactose et le fructose, mais ne dégradent pas le ribitol, le dulcitol, l'érythritol, le glycérol, le rhamnose ou l' α -D-méthylmannoside.

Il reste que certains auteurs reprochent à cette méthode des variations notamment pour les souches de *Bifidobacterium bifidum* fraîchement isolées. Il préconise, si cette technique est utilisée, d'y associer une recherche de sensibilité à différents substrats bifidigènes permettant en outre de différencier *Bifidobacterium bifidum* variant a (se retrouvant chez l'adulte) de *Bifidobacterium bifidum* variant b (se retrouvant chez le nourrisson) (BEERENS et al., 1980, NEUT et al., 1984, ROMOND et al., 1980).

3-HYBRIDATION ADN-ADN

C'est à partir de 1971 que SCARDOVI et al. ont commencé à utiliser l'homologie ADN-ADN pour la classification des Bifidobactéries.

Il ressort que ce genre n'est pas homogène au point de vue génétique puisque dans certains cas l'homologie entre les DNA est faible, voire nulle. De plus, bien qu'au niveau du phénotype certaines espèces soient distinctes, l'hybridation permet de les regrouper : c'est le cas de *B. infantis*, *B. longum*, *B. liberorum* et *B. lactensis* (SCARDOVI et TROVATELLI, 1974).

A l'inverse, au sein d'une espèce homogène au niveau de la fermentation des sucres une hétérogénéité génétique peut exister entre les différentes souches. C'est notamment le cas de *B. adolescentis* (MITSUOKA, 1984).

Cette étude nous a permis de dresser un tableau des relations entre

**TABLEAU III: CARACTERISTIQUES FERMENTATOIRES DES DIFFERENTES ESPECES DU
GENRE BIFIDOBACTERIUM (MITSUOKA - 1974).**

Species	Xylose	Mannose	Fructose	Galactose	Sucrose	Maltose	Trehalose	Melibiose	Mannitol	Inulin
1. <i>B. bifidum</i>	-	-	+	+	d	-	-	d	-	-
2. <i>B. longum</i>	d	d	+	+	+	+	-	+	-	-
3. <i>B. infantis</i>	d	d	+	+	+	+	-	+	-	d
4. <i>B. breve</i>	-	+	+	+	+	+	d	+	d	d
5. <i>B. adolescentis</i>	+	d	+	+	+	+	d	+	d	d
6. <i>B. angulatum</i>	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+
7. <i>B. catenulatum</i>	+	-	+	+	+	+	d	+	d	d
8. <i>B. pseudocatenulatum</i>	+	+	+	+	+	+	d	+	-	-
9. <i>B. dentium</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
10. <i>B. globosum</i>	d	-	+	+	+	+	-	+	-	-
11. <i>B. pseudolongum</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
12. <i>B. cuniculi</i>	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-
13. <i>B. choerinum</i>	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-
14. <i>B. animalis</i>	+	d	+	+	+	+	d	+	-	-
15. <i>B. thermophilum</i>	-	-	+	+	+	+	d	+	-	d
16. <i>B. boum</i>	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
17. <i>B. magnum</i>	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-
18. <i>B. pullorum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
19. <i>B. suis</i>	+	d	d	+	+	+	-	+	-	-
20. <i>B. minimum</i>	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
21. <i>B. subtile</i>	-	-	+	+	+	+	d	+	-	d
22. <i>B. coryneforme</i>	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-
23. <i>B. asteroides</i> ¹	+	-	+	d	+	d	-	+	-	-
24. <i>B. indicum</i> ¹	-	d	+	d	+	d	-	+	-	-

	D-Ribose	L-Arabinose	Lactose	Cellobiose	Melcitose	Raffinose	Sorbitol	Starch	Gluconate
1. <i>B. bifidum</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-
2. <i>B. longum</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-
3. <i>B. infantis</i>	+	-	+	-	-	+	-	-	-
4. <i>B. breve</i>	+	-	+	d	d	+	d	-	-
5. <i>B. adolescentis</i>	+	+	+	+	+	+	d	+	+
6. <i>B. angulatum</i>	+	+	+	-	-	+	d	+	d
7. <i>B. catenulatum</i>	+	+	+	+	-	+	+	-	d
8. <i>B. pseudocatenulatum</i>	+	+	+	d	-	+	d	+	d
9. <i>B. dentium</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+
10. <i>B. globosum</i>	+	d	+	-	-	+	-	+	-
11. <i>B. pseudolongum</i>	+	+	d	d	d	+	-	+	-
12. <i>B. cuniculi</i>	-	+	-	-	-	-	-	+	-
13. <i>B. choerinum</i>	-	-	+	-	-	+	-	+	-
14. <i>B. animalis</i>	+	+	+	d	d	+	-	+	-
15. <i>B. thermophilum</i>	-	-	d	d	d	+	-	+	-
16. <i>B. boum</i>	-	-	d	-	-	+	-	+	-
17. <i>B. magnum</i>	+	+	+	-	-	+	-	-	-
18. <i>B. pullorum</i>	+	+	-	-	-	+	-	-	-
19. <i>B. suis</i>	-	+	+	-	-	+	-	-	-
20. <i>B. minimum</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-
21. <i>B. subtile</i>	+	-	-	-	+	+	+	+	+
22. <i>B. coryneforme</i>	+	+	-	+	-	+	-	-	+
23. <i>B. asteroides</i>	+	+	-	+	-	+	-	-	d
24. <i>B. indicum</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	+

+ = Positif

- = Négatif

d = Variable

les espèces (différenciées grâce à des critères génétiques) et les groupes (isolés phénotypiquement) (Figure 3; p. 20). On peut souligner que l'espèce *B. bifidum* confirme son originalité tant au point de vue phénotypique que génétique.

4-CARACTERISATION DE PROTEINES

Pour différencier les espèces du genre *Bifidobacterium*, SCARDOVI et coll. ont utilisé les profils électrophorétiques d'enzymes solubles comme la F-6-phosphate phosphocétolase, la transaldolase et la 6 phosphogluconate déshydrogénase.

On retrouve trois types de F-6-phosphate phosphocétolase dans les Bifidobactéries (SCARDOVI *et al.*, 1971). Après purification, il ressort que les enzymes des souches d'origine animale se distinguent de celles d'origine humaine par les activateurs, le pH optimal et la température d'inactivation (SGORBATI *et al.*, 1976). Ces deux groupes sont parfaitement différenciés après l'étude immunologique des transaldolases. Chez les 1206 souches étudiées, 40 isoenzymes de transaldolase et 19 de 6-phosphogluconate déshydrogénase ont été mises en évidence par électrophorèse et zymogramme (SCARDOVI *et al.*, 1979). En y associant une troisième enzyme, la 3-phosphoglycéraldéhyde déshydrogénase, 80 p.100 des souches étudiées sont identifiées (SCARDOVI *et al.*, 1979).

L'utilisation d'antisérums contre huit de ces transaldolases purifiées (SGORBATI et LENDON, 1982; SCARDOVI *et al.*, 1979) permet de déterminer des distances immunologiques. Les distances taxonomiques font apparaître 4 groupes qui coïncident avec la répartition écologique des espèces (SCARDOVI, 1986).

L'électrophorèse de protéines cellulaires a été utilisée sur 1092 espèces du genre *Bifidum* (BIAVATI *et al.*, 1982). Les résultats eurent une bonne corrélation avec les autres critères de classification; ils mirent en particulier en évidence une seule bande protéique commune à l'ensemble du genre, à l'exception de *B. boum*, et permirent de confirmer l'existence de *B. minimum* et *B. subtile*.

5-COMPOSITION DE LA PAROI

Cette étude a été essentiellement réalisée par l'équipe de KANDLER (1968, 1970 et 1974). Il ressort de cette étude que la structure du pepti-

A	B
<i>B. minimum</i>	<i>B. minimum</i>
<i>B. bifidum</i>	<i>B. bifidum</i>
<i>B. thermophilum</i>	
<i>B. boum</i>	<i>B. thermophilum</i>
<i>B. choerinum</i>	
<i>B. subtile</i>	
<i>B. pseudolongum</i>	
<i>B. globosum</i>	<i>B. pseudolongum</i>
<i>B. animalis</i>	
<i>B. magnum</i>	
<i>B. silis</i>	<i>B. animalis</i>
<i>B. pullorum</i>	
<i>B. cuniculi</i>	<i>B. cuniculi</i>
<i>B. longum</i>	<i>B. longum</i>
<i>B. infantis</i>	<i>B. infantis</i> ss <i>infantis</i> <i>B. infantis</i> ss <i>liberatum</i> <i>B. infantis</i> ss
<i>B. breve</i>	<i>B. breve</i> ss <i>breve</i> <i>B. breve</i> ss <i>parvulorum</i>
<i>B. adolescentis</i>	
<i>B. dentium</i>	
<i>B. catenulatum</i>	
<i>B. pseudocatenulatum</i>	<i>B. adolescentis</i>
<i>B. angulatum</i>	
<i>B. asteroides</i>	<i>B. asteroides</i>
<i>B. coryneforme</i>	
<i>B. indicum</i>	<i>B. indicum</i>

FIGURE 3 : RELATION ENTRE LES ESPECES CARACTERISEES PAR L'HYBRIDATION ADN-ADN (A) ET LES ESPECES CARACTERISEES PAR DES CRITERES PHENOTYPIQUES (B). (MITSUOKA - 1984).

doglycane de la muréine des Bifidobactéries se rapproche plus de celle des Lactobacilles que de celle des Actinomycètes. KANDLER *et al.* confirment également l'étude réalisée par CUMMINS *et coll.* (1957) sur la composition en acides aminés de la paroi. On retrouve dans toutes les souches étudiées de l'alanine, de l'acide glutamique et de la lysine, ainsi que de la glucosamine et de l'acide muramique. Par contre, la sérine, le glycoColle, la thréonine et l'acide aspartique sont spécifiques de certaines souches.

Enfin, la composition du mucopeptide de la muréine a été décrite chez certaines espèces (Tableau IV; p. 22).

Les variations de structure de la paroi des Bifidobactéries sont maintenant utilisées pour caractériser les espèces. Ainsi la structure du peptidoglycane permet de distinguer *B. boum* de *B. thermophilum* et *B. minimum* de *B. subtilis* (KANDLER *et LAVER*, 1974). De même la structure des sucres de la paroi bactérienne commence à être étudiée (VEERKAMP *et al.*, 1983; HABU *et al.*, 1987) sans que l'on puisse encore utiliser ces résultats pour comparer les espèces.

6-CONCLUSION

L'ensemble des critères que nous venons d'exposer, auxquels on peut ajouter la structure des plasmides (SGORBATI *et al.*, 1982; 1986), la résistance aux antibiotiques, le G+C %, la morphologie, ont permis de mieux connaître les caractéristiques des espèces du genre *Bifidobacterium*.

Cependant, pour des raisons pratiques les tests de fermentation et l'observation microscopique restent les critères d'identification les plus couramment utilisés.

De plus, associé à une recherche et un isolement systématique, nous avons vu le nombre d'espèces de Bifidobactéries augmenter en fonction des critères pris en compte ce qui nous oblige à comparer les différentes classifications (Tableau V; p. 23).

**TABEAU IV: COMPOSITION DE LA MUREINE CHEZ DIFFERENTES ESPECES DE
BIFIDOBACTERIUM (KANDLER ET LAUER - 1974).**

<i>B. bifidum</i>	Orn (Lys) - DSer - Dasp
<i>B. longum</i>	
<i>B. infantis</i>	Orn (Lys) - Ser - Ala - Thr - Ala
<i>B. breve</i>	
<i>B. asteroides</i>	Lys - Gly
<i>B. adolescentis</i>	
<i>B. angulatum</i>	
<i>B. dentium</i>	
<i>B. pullorum</i>	Lys (Orn) - DAsp
<i>B. subtile</i>	
<i>B. coryneforme</i>	
<i>B. indicum</i>	
<i>B. catenulatum</i>	
<i>B. pseudocatenulatum</i>	Lys (Orn) - Ala - Ser
<i>B. magnum</i>	
<i>B. globosum</i>	
<i>B. pseudolongum</i>	Orn (Lys) - Ala
<i>B. cuniculi</i>	
<i>B. choerinum</i>	Orn (Lys) - Ser (Ala) - Ala ₂
<i>B. animalis</i>	
<i>B. thermophilum</i>	Orn (Lys) - DGlu
<i>B. boum</i>	Lys - DSer - DGlu
<i>B. suis</i>	Orn (Lys) - Ser - Ala - Thr - Ala
<i>B. minimum</i>	Lys - Ser

TABLEAU V : PRINCIPALES CLASSIFICATIONS DU GENRE BIFIDOBACTERIUM
(POUPARD et al. 1973, SCARDOVI et al. 1986.)

EGGERTH 1935	DEHNERT 1957	REUTER 1964	MITSUOKA 1969	SCARDOVI et al 1971	HOLDEMAN ET MOORE 1972	SCARDOVI et al 1986
I	I - II	III a III b V IX X VII VIII	bifidum a bifidum b infantis a infantis b liberorum lactenlis breve a breve b breve c	bifidum infantis breve	bifidum infantis ss infantis infantis ss liberorum infantis ss lactensis infantis - other breve	bifidum breve
II	V	IV VI I a I b I c I d II a II b	parvulorum a parvulorum b adolescentis a adolescentis b adolescentis c adolescentis d longum var longum a longum var longum b longum var animalis a longum var animalis b pseudolongum a pseudolongum b pseudolongum c pseudolongum d thermophilum a thermophilum b thermophilum c thermophilum d	adolescentis longum pseudolongum thermophilum ruminale asteroides suis globasum indicum coryneforme minimum subtile pullorum magnum boum choericum cuniculi	adolescentis A adolescentis B adolescentis C adolescentis D longum pseudolongum thermophilum asteroides suis globasum indicum coryneforme cornutum eriksonii	adolescentis longum animalis pseudolongum thermophilum asteroides dentium angulatum catenulatum pseudocatenulatum suis globasum indicum coryneforme minimum subtile pullorum magnum boum choericum cuniculi

SS: sous espèces

II-ÉCOLOGIE DE *BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM*

A-INTRODUCTION

Les moyens modernes de détermination et d'analyse ont permis de quantifier la flore digestive et d'établir une répartition des microorganismes. En précisant l'importance de la flore intestinale sur l'état de santé DRASAR et HILL (1974) et SAVAGE (1977) donnèrent une nouvelle orientation au rôle physiologique des microorganismes.

En ce qui concerne les Bifidobactéries, deux thèses s'opposent

- 1- Sont-elles de simples marqueurs d'un état de bonne santé ?
- 2- Interviennent-elles vraiment pour un bon fonctionnement du tube digestif ?

B-GENERALITES

Les Bifidobactéries sont répandues dans le tractus digestif de nombreuses espèces animales. Elles se retrouvent essentiellement chez les mammifères, cependant elles ont également pu être isolées chez l'Abeille (*B. coryneforme*, *B. asteroides*, *B. indicum*) et chez la Poule (*B. pullorum*, *B. gallinarum*) (SCARDOVI et TROVATELLI, 1969). Chez l'Homme, cette espèce est inexistante au niveau de l'estomac, ; ensuite la population de Bifidobactéries augmente progressivement pour se retrouver essentiellement au niveau du gros intestin (Tableau VI; p. 25). Certains *Bifidobacterium* se retrouvent au niveau du vagin, d'autres ont été isolés de caries dentaires (*B. dentium*, BOURNE et al., 1978) et dans le pus des abcès (*B. breve* et *B. longum*, SCARDOVI, 1984).

Enfin, les eaux résiduaires sont riches en Bifidobactéries (BOURNE et al., 1978; CARILLO et al., 1985). Leur utilisation comme témoin de contamination fécale humaine reste cependant problématique, d'une part à cause du manque de spécificité car on les retrouve chez d'autres espèces animales, d'autre part à cause de leur durée de vie assez courte en milieu aérobie.

A cause de l'importance qu'on lui attribue sur le bon fonctionnement du tube digestif, c'est surtout l'implantation et l'évolu-

TABLEAU VI: REPARTITION DE LA FLORE BACTERIENNE DANS L'APPAREIL DIGESTIF CHEZ L'HOMME (HAWSWORTH et al., 1971).

GENRE BACTERIEN	ESTOMAC	PARTIE HAUTE DE L'INTESTIN GRELE	PARTIE BASSE DE L'INTESTIN GRELE	GROS INTESTIN	FECES
<u>Bactéroïdes</u>	ND	2,5	3,5	8,0	10,5
<u>Bifidobactérium</u>	ND	2,0	4,0	7,0	10,5
<u>Lactobacillus</u>	ND	1,0	ND	6,5	4,0
Entérobactéria	ND	ND	3,3	7,0	6,0
Entérococci	ND	ND	2,3	7,0	3,5
<u>Clostridium</u>	ND	ND	ND	ND	3,0
<u>Veillonella</u>	ND	ND	ND	3,0	3,0
Levures	ND	1,0	2,3	ND	1,0

Unité: \log_{10} de cellules viables par gramme de poids sec

ND : < 10 par gramme

(exemple 10,5 = 310^{10} , 2,5 = 316)

tion chez l'Homme qui ont été étudiées ainsi que l'influence de la flore sur la santé.

C-IMPLANTATION CHEZ L'HOMME

Les Bifidobactéries constituent une part importante de la flore normale chez l'Homme. Chez le nouveau-né, elles apparaissent entre deux et cinq jours et se maintiennent ensuite à un niveau important. Nous envisagerons tout d'abord les facteurs de développement chez le nourrisson et ensuite son évolution chez l'adulte.

1-ETABLISSEMENT DE LA FLORE BIFIDE CHEZ LE NOUVEAU-NÉ :

Avant la naissance, le fœtus se développe dans un environnement stérile. Ensuite, l'apparition de la flore du tractus digestif est rapide : le colon dès 48 heures après la naissance contient de 10^9 à 10^{10} bactéries par gramme de selle (BEZIRTOGLOU, 1985; MITSUOKA et HAZAKAWA, 1972, MOREAU et al., 1986). Les Bifidobactéries apparaissent quant à elles entre le troisième et le cinquième jour (MITSUOKA et HAZAKAWA, 1972). Le mode de naissance, le type d'alimentation, l'environnement et l'individu influencent ce processus.

a-Mode de naissance :

L'enfant né par voie basse est contaminé au contact de la flore vaginale ou fécale de la mère. Cependant, chez les enfants nés par césarienne on note également l'implantation de Bifidobactéries (BEZIRTOGLOU, 1985). Cette flore apparaît dans ce cas plus tardivement. Dans tous les cas, la flore qui s'implante chez le nouveau-né ne correspond pas forcément à celle retrouvée au niveau vaginal ou fécal. L'origine de la contamination reste donc incertaine. Elle ne peut pas être due au lait maternel, et dans les premiers jours, les enfants nourris au lait commercial ont sensiblement la même flore que ceux nourris au sein.

Dans le cas d'une naissance par voie basse, la flore bifide s'installe dans la première semaine (BULLEN et al., 1977; MITSUOKA et al.,

1972; MOREAU et al., 1986; YOSHIOKA et al., 1983; 1984). Elle constitue la population la plus importante de la flore fécale.

Dans le cas d'enfants nés par césarienne, l'implantation de la flore bifide est plus tardive (deux semaines), sans que l'allaitement au lait maternel n'entraîne une apparition plus rapide des Bifidobactéries.

b-Alimentation :

Il semble difficile d'affirmer l'importance de l'allaitement dans cette implantation. Si chez les enfants nourris au lait maternel, elle est plus rapide et plus importante, on constate que chez les enfants nourris au lait maternisé la flore bifide est supplantée par les *Bacteroides* et *Clostridium* durant les premiers jours (Tableau VII;p. 28); cependant la différence s'atténue avec l'âge et dans un délai de un à trois mois la flore anaérobie facultative atteint des niveaux plus élevés et ce dans les deux types d'alimentation (BENNO et al., 1984; ROBERTS et al., 1984; STARK et LEE, 1982).

De plus, on n'a pas pu mettre en évidence la sélection d'une espèce de *Bifidobacterium* en fonction du type d'alimentation (NEUT et al., 1981; YUHARA et al., 1983; BENNO et al., 1984; BIAVATI et al., 1984).

L'équilibre de cette flore intestinale et en particulier la prédominance de la flore bifide est très sensible aux modifications de régime alimentaire (arrêt de l'allaitement maternel, sevrage) d'autant plus si ces modifications sont brutales (LUGOVSKAIA et LADODO, 1984; NEUT et al., 1985) et plus ou moins bien adaptées (LUGOVSKAIA et LADODO, 1984).

c- Individualité et environnement :

Outre les modifications de cette flore intestinale dues à l'alimentation, on ne peut négliger l'influence des modifications de l'environnement (habitudes obstétricales, utilisation d'antibiotiques) ainsi que du lieu de l'accouchement (MITSUOKA, 1984; POUPARD et al., 1973) et de la nurserie. Les autres variations sont à mettre sur le compte de l'individualité.

Chez les prématurés, plusieurs auteurs (GONCHAROVA, 1979; STARK et LEE, 1982; STEVENSON et al., 1985) ont souligné les difficultés d'implantation des *Bifidobacterium* alors que les *Bacteroides* et les Entérobactéries avaient un comportement normal.

TABLEAU VII: INFLUENCE DU TYPE D'ALLAITEMENT SUR LA COMPOSITION DE LA FLORE FECALE DU NOURRISSON (MITSUOKA 1984)

<u>Genre bactérien</u>	ENFANT NOURRI AU LAIT ARTIFICIEL		ENFANT NOURRI AU LAIT MATERNEL	
	log N	Fréquence %	log N	Fréquence %
Entérobactérie	9,5 ⁺ 0,5	100		
Staphylocoques	0,5 ⁺ 1,7	100	5,8 ⁺ 1,9	97
Streptocoques	9,8 ⁺ 0,6	100	7,9 ⁺ 1,5	100
Lactobacillus	7,2 ⁺ 1,5	78	6,8 ⁺ 1,7	80
Bifidobacterium	10 ⁺ 2,2	97	10,7 ⁺ 0,9	100
Eubacterium	7,3 ⁺ 4,1	78	3,1 ⁺ 4,6	33
Bacteroides	9,9 ⁺ 1,1	100	6,1 ⁺ 4,3	67
Peptococcus	7,9 ⁺ 4,0	80	2,4 ⁺ 4,1	27
Clostridium Perfringens	6,4 ⁺ 2,5	50	1,0 ⁺ 2,3	17
Autre Clostridium	0,9 ⁺ 2,6	10	1,3 ⁺ 3,2	13
Veillonellae	5,9 ⁺ 4,6	63	5,8 ⁺ 3,4	83
<u>Espèce dans le genre</u>				
<u>Bifidobacterium</u>				
B. bifidum	9,3 ⁺ 1,0	23	9,9 ⁺ 0,6	70
B. infantis	10,2 ⁺ 0,2	8	10,6 ⁺ 0,4	7
B. breve	10,2 ⁺ 0,7	93	10,7 ⁺ 0,7	90
B. adolescentis	9,8 ⁺ 0,9	53	9,6 ⁺ 0,6	40
B. longum	9,5 ⁺ 0,9	45	9,6 ⁺ 0,8	67

N = nombre de bactéries par grammes de feces

BENNO et coll. (1985) ont d'autre part observé qu'un déficit en vitamine K chez l'enfant s'accompagne d'une diminution des Bifidobactéries.

2-EVOLUTION CHEZ L'HOMME

Les Bifidobactéries ont tendance à diminuer avec l'âge, surtout après 65 ans, au profit des *Clostridium*, *Lactobacillus*, *E. coli* et *Streptococcus* (Tableau VIII; p. 30). On note également une sélection des espèces en fonction de l'âge (Tableau IX; p. 31). Si *B. infantis*, *B. brevis*, *B. longum* type b et *B. bifidum* type b ne se rencontrent que chez le nourrisson, *B. adolescentis* par contre est exclusivement retrouvé chez l'adulte (BIAVATI et al., 1984).

3-ROLE DE LA FLORE BIFIDE

Le rôle des Bifidobactéries a surtout été envisagé chez l'enfant, d'une part à cause de son importance dans la flore intestinale et d'autre part à cause de son rôle sur son état de santé.

Il semblerait que les Bifidobactéries interviennent au niveau du tractus digestif en inhibant l'implantation d'un certain type de flore qui pourrait provoquer des désordres digestifs. La flore bifide réprime le développement des *Bacteroides* et Entérobactéries durant l'allaitement maternel, alors que l'alimentation au lait maternisé induit l'implantation d'une flore bifide mais non répressive vis-à-vis de ces deux genres bactériens (BOURRILLON et al., 1980; MITSUOKA et al., 1972). Il est également admis (BEZIRTOGLOU, 1985) que *Clostridium perfringens* ne se maintient pas chez le nourrisson en présence de *Bifidobacterium bifidum*. Récemment, CORTIER et al. (1985) ont cependant montré dans le tube digestif de Souris qu'une souche de *B. bifidum* inhibait la production de toxine due à *Clostridium difficile*. Si on a longtemps considéré que les Bifidobactéries ne jouaient aucun rôle dans la protection de l'enfant vis-à-vis des diarrhées à rotavirus (RASIC et KURMANN, 1983), et que seul le lait de Femme protégeait l'enfant contre l'agent infectieux, il semble que les Bifidobactéries puissent s'opposer dans ce cas à une altération importante de la flore digestive. Ainsi, les Bifidobactéries ne sont pas de simples témoins de la bonne santé de l'intestin mais leur effet bénéfique est réel.

TABLEAU VIII: VARIATION DE LA COMPOSITION DE LA FLORE FECALE EN FONCTION DE L'AGE. (MITSUOKA - 1984).

	ENFANT DE 1 à 4 JOURS		ENFANT DE 4 à 6 ANS		ADULTES DE 20 à 64 ANS		ADULTES DE 65 à 86 ANS	
	log N	Fréquence %	log N	Fréquence %	log N	Fréquence %	log N	Fréquence %
<i>Bacteroides</i>	8,6 ± 1,7	41	10,4 ± 0,6	100	10,3 ± 0,6	100	10,0 ± 0,8	100
Eurobactéries et lactobacilles anaérobies	0	0	9,9 ± 0,4	24	9,9 ± 0,8	93	9,5 ± 0,9	76
Cocci anaérobies gram +	0	0	8,1 ± 0,9	14	8,9 ± 1,8	52	7,7 ± 2,2	35
Bifidobactéries	9,3 ± 2,5	47	10,1 ± 0,6	97	9,8 ± 0,7	100	9,4 ± 0,8	85
Streptocoques	8,5 ± 1,7	100	7,8 ± 1,3	100	7,7 ± 1,3	100	8,2 ± 1,3	100
Entérobactéries	9,3 ± 1,3	100	8,0 ± 1,4	100	8,2 ± 1,3	100	7,8 ± 1,3	100
Lactobacilles	6,4 ± 1,9	53	7,0 ± 1,8	93	6,7 ± 1,8	100	8,0 ± 1,5	99
<i>Veillonellae</i>	5,6 ± 2,2	23	5,2 ± 1,9	86	4,8 ± 2,3	55	6,1 ± 2,0	64
<i>Clostridium perfringens</i>	5,9 ± 3,0	35	5,7 ± 2,0	79	4,8 ± 1,7	52	6,6 ± 1,9	92
Staphylocoques	6,2 ± 1,7	100	4,0 ± 1,3	86	4,4 ± 1,8	90	4,3 ± 2,1	60
Levures	3,5 ± 1,3	41	4,2 ± 1,3	86	3,7 ± 1,2	69	4,6 ± 1,5	71

TABLEAU IX: VARIATION DES ESPECES DU GENRE BIFIDOBACTERIUM EN FONCTION DE L'AGE (FREQUENCE D'ISOLEMENT EN %)
(MITSUOKA - 1984).

Espèces dans le genre Bifidobactérium	Enfants de 1 à 4 jours	Enfants de 4 à 6 ans	Adultes de 20 à 64 ans	Adultes de 64 à 85 ans
Nombre d'individus testés	52	28	42	18
<u>B. bifidum</u> type a	2	11	7	3
<u>B. bifidum</u> type b	10		1	1
<u>B. infantis</u> ss infantis				
type a	16			
type b	13			
ss liberorum	2	1		
ss lactentis	1			
<u>B. breve</u> ss breve type a	1			1
type b	1			
type c	3			
ss parvulorum				
type a	6			
type b	2	1		
<u>B. adolescentis</u> type a	5	12	17	4
type b	1	8	22	15
type c	8	14	23	7
type d	1	1	5	1
<u>B. longum</u> type a	5	11	20	5
type b	14	9	7	1

Si les relations entre les microorganismes sont bien développées et étudiées *in vitro*, le passage *in vivo* est plus délicat notamment chez le nourrisson. Les difficultés rencontrées proviennent du maintien à de hauts niveaux de la flore bifide dans l'intestin. L'utilisation des facteurs bifidigènes devrait résoudre ce problème et il est donc nécessaire de faire le point des connaissances actuelles sur ce sujet.

FACTEURS BIFIDIGENES

INTRODUCTION

Avant 1950, lorsque l'utilisation du lait en poudre faisait ses premiers pas, il était reconnu que le lait de Femme était supérieur au lait de Vache pour l'alimentation du nouveau-né. En effet, on constatait une meilleure santé des enfants nourris au sein, moins de maladies (particulièrement de gastroentérites), et une mortalité plus faible. Un certain nombre d'hypothèses ont été émises pour expliquer cette observation. Le lait de Femme contient des protéines ayant une activité antivirale et antibactérienne (IgA de sécrétion), des macrophages, des cellules lymphoïdes et des protéines ferriques (lactotransferrine). Mais par dessus tout, ces faits coïncident avec une différence de flore intestinale suivant le mode de nutrition. Dans les intestins des enfants nourris au sein, le bifide est prédominant. Par contre, chez les nourrissons soumis à une alimentation artificielle, le nombre de coliformes est très élevé, les formes anaérobies gram-négatives sont présentes en grande quantité et les bifides sont peu nombreux (HAENEL, 1970). Ceci suggère que les *B. bifidum* peuvent avoir une influence positive sur le maintien de la bonne santé des enfants nourris au lait de Femme. Aussi de nombreux chercheurs ont essayé de faire croître artificiellement *B. bifidum* "*in vitro*" et de le maintenir "*in vivo*". Les études concernant les facteurs de croissance des Bifidobactéries ont suivi deux voies :

- I- Modification de la composition du lait de Vache : "maternisation"
- II- Identification de facteurs bifidus et bifidigènes.

I- MODIFICATION DE LA COMPOSITION DU LAIT DE VACHE

A-GENERALITES

Les travaux sur les différentes compositions des laits ont essentiellement porté sur le lait de Femme et sur le lait de Vache, qui sont les plus généralement utilisés dans l'alimentation du nourrisson. Ces recherches ont précisé les différences qualitatives et quantitatives existant entre ces deux laits, faisant du lait humain un aliment de choix. Elles revêtent une importance particulière du point de vue de la "maternisation" du lait de Vache.

B-LE LACTOSE ET SES DERIVES

SITTLER (1908) est le premier à affirmer que l'addition de lactose dans le lait de Vache provoque la croissance des Bifidobactéries. Des études ont montré que l'addition de 12 p.100 de lactose (P/V) (GERSTLEY et al., 1932; MANCIAUX, 1958) ou d'au moins 10 p.100 (BESSAU, 1937, 1938) provoque l'apparition d'une flore gram-positive dans les fèces.

L'effet bifidigène du β -lactose a été annoncé par plusieurs auteurs (MALYOTH et KIRIMLIDIS, 1939; MALYOTH et STEIN, 1953; DUSTERWALD et al., 1950; DELTHIL, 1953). Mais cet effet a été infirmé par d'autres (FRISELL, 1951; PETUELY, 1957; LEVESQUE, 1959). L'administration orale du lactose donne des effets temporaires et partiels de baisse du pH (ROSS et DAWES, 1954). Apparemment, le lactose ne parvient pas au gros intestin en quantité suffisante pour provoquer la croissance des Bifidobactéries.

Le chauffage du lait de Vache contenant un ajout de lactose a été proposé comme un moyen de retarder l'absorption intestinale (BESSAU, 1937, 1943; KLEINSCHMIDT, 1949). Cette méthode induit la formation de nouveaux composés bifidigènes attribuée à la modification du lactose.

Des laits artificiels, recevant des compléments en maltodextrines (MALYOTH, 1949) ou en dextrine-cystéine, sont des supports pour la flore bifide et suppriment les coliformes dans les intestins. Cependant, d'autres études utilisant des dextrines indiquent que l'effet est faible (LEVESQUE, 1959) ou même négligeable (PETUELY, 1957). Les effets de ces sucres sont donc contradictoires, ce qui indique que d'autres facteurs doivent intervenir.

C-LES AUTRES CONSTITUANTS

1-LES PROTEINES ET LES SELS

Certains auteurs ont remarqué que le fort taux de lactose et le faible pouvoir tampon du lait humain favorisent un pH acide des fécés (ADAM, 1921, 1925; CRUISCHANK, 1925). D'autres études ont montré que la forte concentration en protéines (caséine en particulier) et en phosphate de calcium dans le lait de Vache inhibe la croissance des Bifidobactéries, tandis que le fort taux de cystine du lait humain la favorise (ADAM, 1949; BLAUROCK, 1937). Ces observations ont conduit au développement de laits de Vache modifiés avec une teneur réduite en caséine et en phosphate de calcium et supplémentés en lactose et cystine.

2-LES ACIDES GRAS

Les acides gras présents dans le lait de Vache sont des inhibiteurs de la croissance des Bifidobactéries. Les acides laurique et myristique ont l'effet le plus important (TOMARELLI et al., 1950; GYLLENBERG et al., 1954, 1956). Une étude complémentaire a confirmé l'effet néfaste de certains acides gras dans l'ordre suivant : propionique, butyrique, palmitique, stéarique tandis que les acides plus insaturés (oléique, linoléique) ont peu d'effet (OISHI, 1966).

Pendant la forte teneur en acides gras essentiels (linoléique, linolénique) du lait de Femme a une fonction nutritionnelle importante. On a donc modifié le lait de Vache en remplaçant ses acides gras constitutionnels par des huiles végétales contenant une forte proportion de ces produits essentiels.

II-IDENTIFICATION DE FACTEURS BIFIDIGENES

A-DEFINITION

Les facteurs bifidigènes sont des facteurs de croissance nécessaires au développement des *Bifidobacterium*.

Très tôt, on a trouvé que certains constituants du lait humain écrémé provoquaient la croissance des Bifidobactéries (MORO, 1907;

SCHÖNFELD, 1926) , mais il a fallu plus de vingt ans pour réussir à les identifier. Il existe plusieurs types de facteurs de croissance définis par leur capacité à stimuler spécifiquement une espèce de *Bifidobacterium*. L'espèce *B. bifidum* se divise en deux variants: le variant a essentiellement retrouvé chez l'adulte et le variant b retrouvé chez l'enfant. Ces deux variants requièrent des facteurs de croissance différents. Les facteurs bifidigènes spécifiques du variant b sont supportés par des structures oligosaccharidiques alors que ceux du variant a sont plutôt de nature peptidique.

Quatre groupes de facteurs bifidigènes sont décrits dans la littérature :

- Le lactulose, ou facteur de PETUELY,
- Les oligosaccharides contenant de la N-acétylglucosamine appelés bifidus facteur 1 (BF 1) ,
- Les peptides obtenus par digestion enzymatique de caséine, ou bifidus facteur 2 (BF 2), ou encore facteur de RAYNAUD,
- Des constituants divers.

B-LE LACTULOSE

Selon PETUELY (1949,1957), le lactulose est un facteur bifidigène. Ce disaccharide est composé d'une molécule de galactose et d'une molécule de fructose. L'adjonction de ce disaccharide au lait artificiel à un taux de 1 à 1,5 gramme par kilogramme et par jour ou de 1 à 2 p.100 de l'aliment stimule la croissance de *Bifidobacterium* en 24-96 heures. Le rapport lactose/protéine doit être préférentiellement de 2,6 (PETUELY, 1957). Les produits d'hydrogénation du lactulose (lactite, lactulite) ont également un effet bifidigène. Ils sont ajoutés séparément ou ensemble à des taux de 3 g. pour une ration alimentaire de 292 kJ. et un rapport lactose/protéine de 2,5 à 5 (PETUELY, 1966). L'ingestion de lactulose chez l'adulte provoque aussi la croissance de *Bifidobacterium* (HOFFMAN, 1966). Cet effet s'explique car contrairement au lactose, le lactulose échappe à la digestion et à l'absorption intestinale. Il parvient jusqu'au côlon où il devient une source d'énergie pour la flore bifide (HOFFMAN et al., 1964). Mais le lactulose n'est pas présent à l'état libre dans le lait humain. Il résulte de la transformation du lactose par chauffage du lait; de plus il est inefficace *in vitro*. C'est pourquoi RAYNAUD (1959) lui dénie le nom de facteur bifidigène. Son adjonction permet l'augmentation

des Bifidobactéries et des Lactobacilles *in vitro*. Mais il est aussi utilisé par la majorité des *E coli* (YOSHIOKA, 1971). Aussi lorsqu'il est absorbé à fortes doses, il provoque fréquemment des diarrhées fermentatives.

C-BIFIDUS FACTEUR 1 DE GYORGY (BF 1)

1-MISE EN EVIDENCE

GYORGY et al. (1954) découvrent un mutant de *L. bifidus* var. *penn* qui croît uniquement en présence de lait maternel. Ce facteur bifidigène du lait humain appelé facteur bifidus 1 n'est ni détruit ni altéré par chauffage. GYORGY et al. (1954) constatent que les laits d'espèces variées et les sécrétions humaines en sont des sources naturelles. Le colostrum humain est le plus actif suivi par le colostrum de Rat puis le lait de Femme et le lait de Rat. GYORGY voit dans la forte teneur du colostrum humain en facteur bifidus un élément susceptible d'expliquer la rapide implantation du bifide. Le lait de Chat possède une bonne activité, suivi par celui de l'Ane, du Chien, du Singe et du Lapin. Par contre, les laits de ruminants sont faiblement actifs (Brebis, Vache, Chèvre). Cependant, il existe une concentration appréciable de facteur de croissance dans le lait de Vache.

Les facteurs bifidigènes du lait et du colostrum humain n'ont pas de masse moléculaire homogène. En effet ils peuvent être séparés en une fraction dialysable représentant de 40 à 75 p.100 de l'activité totale et une fraction non dialysable de 25 à 60 p.100 (GAUHE et al., 1954; GYORGY et al., 1974). La suite des travaux de GYORGY et KUHN a permis de démontrer que le gynolactose de POLONOVSKI et LESPAGNOL (1930) est le support de l'activité bifidigène du lait de Femme. Les travaux effectués dans notre laboratoire (GRIMMONPREZ et MONTREVIL, 1968, 1975, GRIMMONPREZ, 1972) ont permis de mieux connaître la structure des oligosaccharides du lait humain. A ce jour, plus de 60 structures ont été mises en évidence. Par différentes techniques chromatographiques, ils isolent des composés actifs qui contiennent tous de la N-acétyl-glucosamine. La présence de N-acétylglucosamine semble donc indispensable à l'expression de cette activité, hypothèse émise par GAUHE et al. en 1954 et confirmée par la suite par GYORGY et al. en 1955.

2-RELATION STRUCTURE-ACTIVITE

Des études ont été entreprises afin de mieux définir l'importance de la N-acétylglucosamine dans l'expression de l'activité bifidigène. Dans ce but des dérivés de ce monosaccharide ont été obtenus par synthèse et par hydrolyse d'oligosaccharides. Les plus importants sont :

- la N-acétyllactosamine
- les N- β -glucosides dérivés de la N-acétylglucosamine
- les N-acyls dérivés de la N-acétylglucosamine.

a-La N-acétyllactosamine :

TOMARELLI *et al.* (1954) ont testé plusieurs substances naturelles de facteur de croissance BF 1, la mucine de Porc leur a paru la meilleure source. Ils réalisent une hydrolyse douce de celle-ci et isolent ainsi un disaccharide fortement actif composé de galactose et de N-acétylglucosamine. ZILLIKEN *et al.* (1955 a, 1955 b) obtiennent le même produit également par hydrolyse mais aussi en incubant des cellules de *B. bifidum* var. *penn* avec du lactose et de la N-acétylglucosamine. Ils identifient ce disaccharide comme étant le 4-O- β -D-Galactopyrannosyl-N-acétyl-D-glucosamine. Ces auteurs constatent que la N-acétylglucosamine libre est peu efficace par rapport à ce composé.

b-Les N- β -glycosides et les N-acyls dérivés de la N-acétylglucosamine :

ROSE *et al.* (1954) et ZILLIKEN *et al.* (1955 c) constatent que les α - et β -méthyl-N-acétyl-D-glucosamine présentent des propriétés intéressantes. L'anomère β est un facteur de croissance de *B. bifidum* var *penn* et l'isomère α est quant à lui inactif. Mais, l'addition de dérivés de type α augmente l'effet du β -glycoside. Par ailleurs, l'éthyl- et le N-propyl-N-acétyl- β -D-glucosaminide sont considérablement plus actifs que les composés méthylés (Tableau X; p. 38). Ils ont une activité comparable à celle de la N-acétyllactosamine (GYORGY et ROSE, 1955). Les N-acyl dérivés ont été découverts plus récemment par LAMBERT et ZILLIKEN (1965); les plus actifs sont la N-benzoylglucosamine et la N-carboéthoxy-D-glucosamine.

Ces composés synthétiques marqués vont permettre à O'BRIEN *et al.* (1960) et LAMBERT *et al.* (1965) de démontrer que la N-acétylglucosamine est incorporée dans l'acide muréique présent dans la paroi cellulaire. Les

TABLEAU X : FACTEUR BIFIDUS 1 : REACTIVITE DE DIVERS OLIGOSACCHARIDES OBTENUS PAR SYNTHESE CHIMIQUE SUR LA CROISSANCE DE *B. BIFIDUM*
ZILLIKEN *et al.* (1955 c)

COMPOSES	(*) UNITES (en mg)
4-O- β -D galactopyranosyl-N-acétyl-D-glucosamine	0,06
3-O- β -D " " "	1,50
6-O- β -D " " "	0,90
N N'-diacétyl-chitobiose	1,2-2,2
α -alkyl-N-acétyl-D-glucosaminide	inactifs
β -méthyl-N-acétyl-D-glucosaminide	0,1-0,2
β -éthyl " "	0,04-0,06
β -n propyl " "	0,04-0,06
β -isopropyl " "	0,09
β -n butyl " "	0,065
β -benzyl " "	0,095
β -phényl " "	0,05

(*) UNITE = quantité de substance qui, ajoutée à un milieu de culture, donne une croissance égale à une préparation contenant 0,06 ml de lait humain.

activités de croissance de la N-acétylglucosamine et de ses dérivés sont considérablement différentes. La N-acétylglucosamine présente le moins d'activité. Elle est rapidement convertie en fructose-6-phosphate, lui-même métabolisé en acétate et lactate. *Bifidobacterium bifidum* var. *penn* produit plus d'acide en présence de N-acétylglucosamine qu'en présence de β -éthyl, N-caproyl et N-benzoyl glucosamine (VEERKAMP, 1969 a et b; YOSHIOKA, 1971). Ainsi, la disparition rapide de la N-acétylglucosamine serait défavorable à son incorporation dans la paroi. La substitution par un radical, peu propice à sa dégradation en fructose-6-phosphate, permet par contre son incorporation dans le cycle de biosynthèse de la paroi. La différence d'activité entre les méthyl-, éthyl- et acyl- dérivés est mal élucidée: pour LAMBERT et ZILLIKEN, plus les composés sont hydrophobes, mieux ils passent à travers la membrane cellulaire du fait de leur caractère lipophile.

Pour être actif sur *L. bifidus* var. *penn*, une substance doit posséder les caractéristiques suivantes:

- être un dérivé de la N-acétylglucosamine,
- être capable de traverser la membrane cellulaire de la bactérie,
- être accessible au système enzymatique permettant la synthèse de la paroi (ne pas être dégradée trop vite).

Cependant la présence de N-acétylglucosamine ne suffit pas à l'expression de l'activité (Tableau XI; p. 40). C'est le cas pour des oligosaccharides isolés d'urine ou du lait de Femme. Ainsi les oligosaccharides et les glycoprotéines contenant de l'acide N-acétylneuraminique sont inefficaces comme agents de croissance pour *B. bifidum* var. *penn* (NICOLAI, 1971; NICOLAI et ZILLIKEN, 1972; GYORGY et al., 1974). Lorsqu'ils sont traités par une neuraminidase, la croissance est alors exponentielle à leur quantité de N-acétylglucosamine. *B. bifidum* var. *penn* possède une neuraminidase spécifique des liaisons α 2,3, de l'acide sialique mais elle a peu d'effet sur les liaisons α 2,6.

Pour l'instant cette étude ne concernait que *B. bifidum* var. *penn*; ROMOND et al. (1980) ont démontré que *B. bifidum* var. *b* est une population homogène qui a besoin du lait de Femme pour croître. Elle en utilise les facteurs glucidiques (SEKA, 1982). Cependant, ils constatent que toutes les souches de *B. bifidum* var. *b* n'ont pas besoin des mêmes quantités de facteurs oligosaccharidiques pour croître (NEUT, 1984).

**TABLEAU XI : FACTEUR BIFIDUS 1 : REACTIVITE D'OLIGOSACCHARIDES ISOLES DU
LAIT DE FEMME SUR LA CROISSANCE DE B. BIFIDUM.**

(GYORGY *et al.* 1955, GRIMMONPREZ 1972, NICOLAI 1971)

OLIGOSACCHARIDES DEPOURVUS D'AZOTE		ACTIVITE
TRISACCHARIDES	2' fucosidolactose	(-)
	3' fucosidolactose	(-)
	galactosyl-lactose	(-)
TETRASACCHARIDES	lactodifucotétraose	(-)
OLIGOSACCHARIDES CONTENANT DE LA N-ACETYLGLUCOSAMINE		
OLIGOSACCHARIDES NEUTRES		
TETRASACCHARIDES	lacto-N-tétraose	+++
	lacto-N-néotétraose	+++
PENTASACCHARIDES	lacto-N-fucopentaose I	+++
	lacto-N-fucopentaose II	+++
HEXOSACCHARIDES	lacto-N-difucohexaose I	+++
OLIGOSACCHARIDES ACIDES		
HAUTS POIDS MOLECULAIRES		(-)

D-LE FACTEUR DE RAYNAUD BF 2 :

RAYNAUD en 1959 est le premier à décrire un facteur essentiel pour la croissance de *B bifidum* souche Tissier *in vivo* et *in vitro*. Ce facteur est appelé facteur bifide 2. En effet, il avait constaté que cette souche était insensible à la lactosamine ou à la β -éthyl-N-acétylglucosamine. Mais celle-ci est sensible aux produits d'hydrolyse de protéines, plus spécifiquement ceux de la caséine bovine. Les BF 2 sont obtenus par action d'enzymes telles que la pepsine, la trypsine et la papaïne sur les protéines . Un mélange d'acides aminés ou le produit de l'hydrolyse complète de protéines ont des activités négligeables. Il s'agirait donc de peptides non glycosylés différents de la streptogénine (RAYNAUD, 1959) mais dont la structure n'est pas encore connue (ROSE et GYORGY, 1963; RAYNAUD et BIZZINI, 1971).

Les sources naturelles de BF 2 sont rares et les meilleures sont des hydrolysats enzymatiques de protéines. Le tableau XII page 42 montre le taux de BF 2 dans différents produits.

Un rapport clinique a montré que l'administration orale de ce facteur avec du lait en poudre augmente le nombre de Bifidobactéries mais n'établit pas la flore bifide. Ce facteur semble être digéré et absorbé dans les intestins (NEIMANN *et al.*, 1959). Les hydrolysats de caséine sont surtout actifs sur le variant a de *Bifidobacterium bifidum* mais ils ont aussi une activité de type *Bifidobacterium bifidum* b, qui est de 20 à 50 fois plus faible cependant (SEKA ASSI, 1982, KEHAGIAS *et al.*, 1977).

E-CONSTITUANTS DIVERS

1- GLYCOPROTEINES ET GLYCOPEPTIDES

Les glycoprotéines du colostrum et du lait humain sont efficaces sur les deux types de variants; HIRANO *et al.* (1968) isolent du colostrum humain 8 fractions de glycopeptides ayant une activité sur la croissance quand ils sont présents à une concentration de 2 mg pour 10 ml dans un milieu contenant du lait écrémé.

NICHOLS *et al.* (1974) isolent 7 fractions de glycoprotéines du colostrum humain et deux fractions du colostrum de Vache. Ils constatent que toutes les fractions du colostrum humain ont une activité promotion-

TABLÉAU XII : FACTEUR BIFIDUS 2 : REACTIVITE SUR LA CROISSANCE DE
B. BIFIDUM DE DIVERSES SUBSTANCES
(D'APRES RAYNAUD, 1959)

SUBSTANCES	TITRES (EN UNITE / g)
Lait humain frais	1 à 20
Lait humain traité par la papaïne	20 à 100
Pepsine commerciale brute	1250
Trypsine commerciale	85
Papaïne brute	1000
Extrait d' <i>Aspergillus oryzae</i>	500 à 1000
Extrait de foie	20 à 660
Digestion papainique de foie de veau	2500
Caséine brute	inactive
Hydrolysats de caséine par :	
. la papaïne	800
. la pepsine	500
. la trypsine	500

UNITE = plus faible quantité de BF 2 qui donne une croissance
correspondant à une acidité totale de 1 ml d'acide N/10.

nelle de croissance pour *Bifidobacterium bifidum* var. *penn.* L'activité spécifique pour *Bifidobacterium bifidum* var. *b* est corrélée dans ce cas à la quantité d'hexosamine contenue dans la fraction glucidique.

L'activité bifidigène de la caséine a été également étudiée. BEZKOROVAINY et al. (1979) ne mettent pas en évidence directement de facteurs BB b dans la protéine. Cependant lorsqu'elle est digérée par des enzymes protéolytiques (trypsine, chymotrypsine), elle libère des glycoprotéines de structures proches de celles du lactosérum. L'activité est là aussi fonction de la composition en glucides; en fait, il semble que la caséine humaine native soit bifidigène (BEZKOROVAINY et al., 1981). En effet, l'hydrolyse trypsique n'augmente pas le taux de facteurs BB b mais permet l'accessibilité de ceux-ci. Ils constatent également que la caséine humaine déglycosylée est inhibitrice de *Bifidobacterium bifidum*. Ils en concluent que le microorganisme posséderait un récepteur à sa surface qui pourrait fixer réversiblement la caséine.

2- PANTHÉINE ET JUS DE CAROTTE

Depuis longtemps, les pédiatres administrent une soupe de carottes aux enfants souffrant de diarrhées. GYORGY (1955 b) avait montré que certaines espèces de Bifidobactéries incluant *Bifidobacterium bifidum* var. *penn* avait besoin de pantéthéine pour la croissance car elles ne pouvaient utiliser l'acide pantothénique. OHTA et al. (1971) et KUROMIYA (1960) montrent que la soupe de carottes augmente le nombre de Bifidobactéries *in vivo* et *in vitro*. YOSHIOKA et al. (1968) entreprennent la purification des facteurs bifidigènes du jus de carotte. Ils démontrent que ces facteurs sont des intermédiaires de l'acide pantothénique au coenzyme A. Cependant les activités du coenzyme A et de ses précurseurs varient pour chaque espèce tandis que l'extrait de carotte est actif sur la plupart des espèces. Ils soupçonnent donc la présence d'un facteur autre que le coenzyme A et ses précurseurs.

3- OLIGOSACCHARIDES ET GLYCOPROTEINES PRODUITS PAR D'AUTRES BACTERIES

HOMMA en 1960 a été le premier à démontrer que le milieu de culture d'*Escherichia coli* contenait une substance active sur la croissance du bifide. Elle a été identifiée par YAMASHITA (1976) comme

étant une glycoprotéine. Plus récemment, TANAKA et al. (1983) ont montré que les produits de transgalactosylation synthétisés par certaines bactéries pouvaient être des facteurs de croissance.

III-CONCLUSIONS

Les facteurs bifidigènes sont de nature complexe. On peut cependant constater que les variants requièrent des facteurs de croissance différents. Les uns sont plutôt de nature oligosaccharidique, et les autres de nature peptidique.

Mais nous ne connaissons qu'une part des besoins des Bifidobactéries. Beaucoup de points devront être éclaircis concernant les interactions entre le bifide et les autres bactéries, entre la microflore et les substances nutritives de l'alimentation et entre la microflore et l'hôte.

MATERIEL ET METHODES

I-TECHNIQUES MICROBIOLOGIQUES

A-SOUCHE UTILISER

La souche de *Bifidobacterium bifidum* var. b (AA/22) utilisée nous a été fournie par C. ROMOND (UER de pharmacie de l'université de Lille II) où elle a été identifiée selon les critères de MITSUOKA (1984).

Une souche provenant de la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (DSM) a été utilisée comme souche témoin : *B. bifidum* DSM 20456 (souche type).

B-TECHNIQUES DE CULTURE

1-ISOLEMENT DE LA SOUCHE

La souche de *Bifidobacterium bifidum* a été réisolée par repiquages successifs sur un milieu TPY (Trypticase, peptone, yeast extract) en boîte de Petri. Les manipulations sont effectuées sous atmosphère $N_2/CO_2/H_2$ (75/15/10) à 37°C. La pureté de la souche de la DSM a été vérifiée de la même manière.

2-MILIEU POUR LA FERMENTATION DES SUCRES

Pour contrôler les capacités de fermentation des sucres des différentes souches, nous avons utilisé dans un premier temps une technique en tube et ensuite un contrôle sur une galerie Api 50 CH. Nous avons d'ailleurs utilisé par la suite la galerie Api 50 CH pour un contrôle des cultures en sortie de fermenteur associé à une observation au microscope optique.

Le milieu de fermentation des sucres pour les tubes de culture était le suivant :

peptone	10 g (Institut Pasteur Production, IPP)
chlorure de sodium	5 g (Merck)
extrait de viande	3 g (IPP)
extrait de levure	6 g (IPP)
chlorhydrate de cystéine	0,3 g (Merck)
agar	0,5 g (IPP)
H ₂ O distillée qsp	1000 ml.

L'hydrate de carbone désiré : lactose, cellobiose, mélibiose, saccharose, sorbitol, amidon, ribose, gluconate est introduit à raison de 10 p.100 (p/v).

L'indicateur de pH utilisé est le rouge de phénol. Les milieux sont amenés entre pH 7,4 et 7,5, répartis en tubes et autoclavés durant 20 minutes à 115°C. Après ensemencement, les tubes sont placés à 37°C pendant 1 à 2 jours, le virage de l'indicateur de pH indique une acidification et la fermentation des sucres.

Pour la galerie Api 50 CH, après culture, les cellules sont centrifugées et mises en culture sur un milieu BCYT (ZEIKV *et al.*, 1975) modifié par TOUZEL et ALBAGNAC, 1983.

3-CULTURE EN FLACON DE PENICILLINE

La détermination d'un milieu optimum pour la production d'enzymes est effectuée en milieu liquide dans des flacons munis de bouchons butyl sous atmosphère N₂/CO₂ (85/15) selon la technique de HUNGATE modifiée par MILLER et WOLIN (1974). Les milieux sont réduits au moment de l'emploi par une solution de sulfure de cystéine 2 p.100 (v/v) dans de l'eau. Après stérilisation par autoclavage durant une heure, les flacons sont incubés à 37°C et inoculés à 5 p.100 (v/v) au moyen de précultures. La culture est arrêtée après 96 heures.

Pour la détermination du pH optimum, nous avons utilisé les tampons suivants :

- Tampon phosphate de sodium 0,05 M de pH 5,8 à 7,9
- Tampon MOPS (Sigma) de pH 6,1 à 8,1
- Tampon PIPES (Sigma) de pH 5,7 à 7,7

Les pH ont été contrôlés après autoclavage et en fin de culture.

Pour déterminer le milieu optimum, nous avons utilisé une méthode statistique basée sur la technique du carré gréco-latin (AUDEN *et coll.*, 1967). Celle-ci permet de déterminer l'influence de trois variables sur la production d'enzymes. Les paramètres que nous avons pris en compte sont :

-La concentration en bouillon cerveau coeur (IPP)

-La concentration en glucose, dans ce cas la source de protéine est stérilisée séparément de celui-ci

-La concentration en minéraux : $MnCl_2$, $MgCl_2$ et $CuSO_4$

L'ensemble des milieux de culture que nous avons testé, est donné dans le tableau XIII p.48. L'influence d'un paramètre sur la production d'enzymes sera obtenue en faisant la moyenne des résultats obtenus pour une valeur de ce paramètre.

Des essais de supplémentation en gynolactose, mucine de porc, fraction IV de COHN et de lait de Femme ont été envisagés.

4-CULTURES EN FERMENTEUR

Les essais de milieu en fermenteur ont été effectués dans des fermenteurs SETRIC de 2 litres et de 6 litres. Dans ces essais, nous avons fait varier la concentration en glucose entre 0 et 40 g/l. Nous avons étudié l'influence de l'incorporation dans le milieu de culture de lait de Vache à 5 p.100 (v/v), de lait de Femme à 3,3 p.100 et 6,6 p.100 (v/v) et de gynolactose à 0,5 et 1 g/l. Au cours du refroidissement après stérilisation, les fermenteurs sont mis à barboter sous N_2/CO_2 (85/15). Au moment de chaque prélèvement d'échantillon, on fait barboter de l'azote. La température de fermentation est de 37°C. Le pH est régulé par l'addition de soude 10 M. Les ensemencements des fermenteurs de 2 et 6 litres ont été effectués à 5 p.100 au moyen de précultures de 16 heures réalisées en flacons sans contrôle de pH.

La production de biomasse de *Bifidobacterium bifidum* est réalisée dans un fermenteur SETRIC de 200 litres. Il est ensemencé grâce à un fermenteur de 6 litres

Les cinétiques de production d'enzymes libérées dans le milieu et d'enzymes cellulaires ont été étudiées à partir de cultures en fermenteurs de 6 litres.

Après fermentation, les cellules sont récupérées par centrifugation à 7000 g durant 15 minutes et à 4°C.

C-MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

Les cellules après fermentation sont récoltées par centrifugation, les culots sont alors fixés dans le glutaraldéhyde et placés dans du

TABLEAU XIII : DETERMINATION DU MILIEU MINIMUM :
COMPOSITION DES MILIEUX.

	MINERAUX mM			GLUCOSE g/l			BCC g/l		
	5	2	0	10	5	0	37	20	5
M 1			0			0			5
M 2		2				0		20	
M 3	5					0	37		
M 4		2			5				5
M 5	5				5			20	
M 6			0		5		37		
M 7	5			10					5
M 8			0	10				20	
M 9		2		10			37		

thiocarbohydrazide et du tétraoide d'osmium selon la technique de MALICK *et al.* (1975). Les culots sont ensuite déshydratés par l'alcool et par la méthode du point critique. Les coupes sont observées par microscopie à balayage.

II-TECHNIQUES D'EXTRACTION DES ACTIVITES ENZYMATIQUES

A-CONSERVATION DES CELLULES

Plusieurs essais de conservation de la biomasse en tampon Phosphate de sodium 20 mM pH 7 ont été effectués. Les paramètres que nous avons étudiés sont les suivants :

- la température de conservation : +4°C, -20°C, -80°C
- la lyophilisation
- l'influence du glucose 40 p.100 (P/V) et du glycérol 30 p.100 (V/V).

B-EXTRACTION AUX ULTRA-SONS

L'extraction aux ultra-sons est effectuée grâce à un Sonifer BRANSON B 30 (350 W), elle est réalisée à -10°C de façon à ce que la suspension de cellules n'atteigne pas une température supérieure à 2°C, la fréquence est de 20 Kcycles et l'amplitude de 20 microns. Le milieu d'extraction est du tampon phosphate 20 mM pH 7, l'influence de différentes substances a été envisagée :

- réducteurs : DTT, β -mercaptoéthanol, chlorhydrate de cystéine à une concentration de 1mM
- EDTA 1 mM
- détergents non-ioniques : octyl- β -D-glucopyranoside (Calbiochem)
 - nonidet P 40 (Calbiochem)
 - triton X 100 (Sigma)
 - tween 20 (Sigma)
- détergents anioniques : désoxycholate de sodium (Sigma)
 - N-lauryl-sarcosine (Sigma)
 - sodium dodécyl sulfate (Merck)

-détergent cationique : cétavlon

-détergents zwitterioniques : zwittergent 3-12 (Calbiochem)

zwittergent 3-16 (Calbiochem)

La concentration optimale en cellules dans le milieu d'extraction a été déterminée pour des concentrations de 0,5 à 13 p.100 de cellules sèches (P/V) dans le volume d'extraction (20 ml). De même, nous avons effectué une cinétique d'extraction à la concentration optimale et dans le milieu optimal.

La solution enzymatique obtenue après sonnage est ultracentrifugée à 100.000 g durant une heure, le surnageant constituera la fraction utilisée pour la purification.

D'autre part, différentes vitesses de centrifugation ont été appliquées à la suspension cellulaire obtenue après sonnage (centrifugation de 3.000 à 200.000 g). Les activités enzymatiques et le dosage des protéines sont effectués au niveau de chaque surnageant et de chaque culot de centrifugation.

C-EXTRACTION A LA PRESSE DE FRENCH

Une suspension cellulaire homogène contenant 2,5 g de cellules sèches dans 20 ml de tampon Phosphate de sodium 20 mM pH 6,8, EDTA 1 mM, est portée à 0°C, puis deux passages à la presse de French à 20.000 psi (soit 1.400 bars) sont réalisés.

Différentes vitesses de centrifugation dans les mêmes conditions que pour l'extraction aux ultra-sons sont appliquées à cette suspension. Les activités enzymatiques et le dosage des protéines sont effectués au niveau de chaque surnageant et de chaque culot de centrifugation.

D-EXTRACTION DES ACTIVITES PAR LA PRONASE ET LE LYSOZYME

Après récolte des cellules, celles-ci sont remises en suspension dans un milieu contenant 5 g/l de bouillon cerveau coeur et différentes concentrations de pronase (Merck) et de lysozyme (Sigma). L'incubation se réalise à 37°C durant 4 heures.

Une centrifugation à 100.000 g durant une heure, nous permet d'éliminer les cellules, le surnageant est filtré sur filtre 0,22 μ m et les concentrations en activités enzymatiques et en protéines sont déterminées sur cette solution enzymatique.

E-EXTRACTION DES ACTIVITES AU BUTANOL

A une suspension cellulaire contenant 2,5 g de cellules dans 4 ml de tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 6,8, on ajoute 2,5 ml de butanol. Cette suspension est agitée dans un bain de glace durant 30 minutes. Après centrifugation à 100.000 g durant 30 minutes, la phase butanolique est récupérée, on y ajoute 2,5 ml de tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 6,8. On agite de nouveau cette fraction dans un bain de glace puis on recentrifuge dans les mêmes conditions. Aux deux phases aqueuses récupérées, on ajoute 0,5 volume de butanol, on agite dans un bain de glace, on centrifuge puis la phase aqueuse est dialysée 24 heures contre du tampon phosphate de sodium 10 mM, NaCl 0,5 M pH 6,8. Les concentrations en activités enzymatiques et en protéines sont effectuées sur le dialysat.

III-TECHNIQUES D'ANALYSES

A-BIOMASSE BACTERIENNE

La croissance bactérienne est suivie par turbidimétrie au spectrophotomètre UVIKON 810 (KONTRON) à 660 nm. Le poids sec de cellules est mesuré, après centrifugation, par séchage à l'étuve à 105°C jusqu'à poids constant.

B-DETECTION DES ACTIVITES ENZYMATIQUES SUR GALERIE API-ZYM

Après récolte des cellules de *Bifidobacterium bifidum* par centrifugation à 3000 g durant 15 minutes, les cellules sont reprises dans de l'eau contenant du NaCl 9 p.1000 de façon à obtenir une DO de 1,5 à 660 nm. L'incubation se fait à 37°C dans une chambre anaérobie.

C-MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE FRUCTOSE-6-PHOSPHATE PHOSPHOCETOLASE

On utilise la technique recommandée par SCARDOVI (1986). Après culture sur milieu TPY, 15ml de culture sont centrifugés à 5.000 g durant 10 minutes. Les cellules récoltées sont lavées deux fois dans du tampon phosphate de sodium 0,05 M pH 6,5 additionné de 500 mg par litre de chlorhydrate de cystéine et reprises ensuite dans 1 ml de ce même tampon. La suspension cellulaire est ultra-sonnée à -10°C durant 2 minutes. On ajoute 0,25 ml d'une solution de NaF à 6 g/l et d'iodoacétate de potassium à 10 g/l, et 0,25 ml de fructose-6-phosphate à 80 mg/ml (sel de sodium, pur à 98 p.100 Sigma). Le mélange est incubé à 37°C, la réaction est arrêtée par l'addition de 1 ml d'hydroxylamine/HCl 139 g/l amenée à pH 6,5 avec de la soude 1 M. Après 10 minutes à température ambiante, on ajoute 1 ml d'acide trichloroacétique 15 p.100 (P/V) dans l'eau et 1 ml d'acide chlorhydrique 4 M. La coloration rouge violette apparaît après addition de 1 ml de chlorure ferrique 6 H₂O (P/V) dans l'acide chlorhydrique 0,1 M. La lecture s'effectue à 505 nm contre un blanc préparé sans fructose-6-phosphate.

D-DOSAGE DES PROTEINES

Le dosage des protéines est effectué selon la méthode de BRADFORD (1976). Cette méthode utilise le bleu de coomassie. L'absorbance est mesurée à 595 nm. La gamme étalon est réalisée avec de la sérum albumine bovine (Sigma).

E-MESURES DES ACTIVITES GLYCOSIDASQUES

1-MISE EN EVIDENCE DES ACTIVITES SUR pNP-OSIDES

Pour ces dosages nous utilisons des substrats synthétiques :

- le p-Nitrophenyl- β -D-galactoside
- le p-Nitrophényl- α -D-galactoside

- le p-Nitrophényl-N-acétyl- β -D-glucosaminide
- le p-Nitrophényl-N-acétyl- α -D-glucosaminide
- le p-Nitrophényl- α -L-fucosaminide
- le p-Nitrophényl- α -D-glucosaminide
- le p-Nitrophényl- β -D-glucosaminide
- le p-Nitrophényl- α -D-mannoside
- le p-Nitrophényl- β -D-mannoside
- le p-Nitrophényl-N-acétyl- β -D-galactosaminide

a-Principe :

Les enzymes hydrolysent les pNP-osides en monosaccharide, d'une part, et en p-nitrophénol, d'autre part. Celui-ci devient jaune en milieu alcalin et est dosé par spectrophotométrie.

b-Mode opératoire :

Il dérive de la méthode de GOMORI (1955).

0,1 ml de pNP-oside 10 mM sont mélangés avec
0,2 ml de tampon 0,2 M au pH optimal d'action et
0,1 ml de fraction enzymatique ou suspension cellulaire.

Après incubation à 37 °C la réaction est arrêtée par addition de 0,6 ml de carbonate de sodium 1 M. La densité optique de la solution est mesurée au spectrophotomètre à 400 nm.

Une unité glycosidasique est définie comme la quantité d'enzyme libérant une μ mole de paranitrophénol par minute dans les conditions standard.

2-NISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE α -D-NEURAMINIDASIQUE

a-Principe :

Pour ce dosage on utilise un substrat synthétique : le 4 méthyl umbelliféryl-acide-N-acétyl-neuraminique (Mu-NeuAc). Les neuraminidases

libèrent l'acide N-acétylneuraminique et la méthylumbelliférone qui est dosée par fluorimétrie (λ d'excitation : 370 nm; λ d'émission : 450 nm).

b-Mode opératoire :

A 0,1 ml de Mu-NeuAc 0,1 mM on ajoute
0,2 ml de tampon acétate 0,2 M pH 5 et
0,1 ml de solution enzymatique.

Après incubation à 50 °C pendant 5 minutes la réaction est arrêtée par addition de 1,6 ml de carbonate de sodium 0,5 M.

Une unité de neuraminidase est définie comme la quantité d'enzyme libérant une μ mole de méthylumbelliférone par minute dans les conditions standard.

3-MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE α -L-FUCOSIDASIQUE

La méthode utilisée dérive de la méthode de FINCH (1969).

a-Principe :

Le L-fucose libéré par l'action de l' α -L-fucosidase est dosé par la fucose déshydrogénase. Le fucose libre est oxydé en présence de NAD^+ , qui est réduit en NADH, H^+ . La quantité de NADH, H^+ proportionnelle au monosaccharide libéré est déterminée par spectrophotométrie directe à 340 nm.

b-Mode opératoire :

Le substrat utilisé est un pentasaccharide : le monofucosyl (α 1-2) lacto-N-tétraose (ou substance H).

50 μ l d'une solution de substance H à 4 mg/ml sont mélangés à
250 μ l de solution enzymatique et à
150 μ l de tampon phosphate 0,2 M citrate 0,1 M pH 5.

Après 15 minutes à 45 °C la réaction est arrêtée par chauffage à 100 °C durant 3 minutes. Après refroidissement, on ajoute :

200 μ l de NAD⁺ à la concentration de 2 mg/ml,
150 μ l de tampon TRIS/HCl 0,8 M pH 8,1 et
200 μ l d'une solution de fucose déshydrogénase (AS 150 UI/g) à 2 mg/ml.

Ce mélange est porté 30 minutes à 37 °C et la réaction arrêtée dans un bain de glace.

Une unité de fucosidase est définie comme la quantité d'enzyme libérant une μ mole de fucose par minute sous les conditions standard.

IV-TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES

A-CHROMATOGRAPHIE DE GEL FILTRATION SUR COLONNE DE SUPEROSE 6 et SUR COLONNE DE SEPHAROSE CL 6 B

Les solutions enzymatiques obtenues après les différents types d'extraction sont analysées par gel filtration. La colonne de Superose 6 (Pharmacia) 1 x 30 cm (zone de linéarité 5.000-1.000.000) est montée dans le système Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) et équilibrée dans un tampon phosphate de sodium 0,02 M, NaCl 1 M, pH 7 avec un débit de 15 ml/heure. La colonne de Sépharose CL 6 B (Pharmacia) 1,6 x 100 cm (zone de linéarité 10.000-4.000.000) est équilibrée dans un tampon phosphate de sodium 0,02 M, NaCl 1 M, pH 7 avec un débit de 10 ml/heure. Les colonnes sont calibrées avec les protéines suivantes : ribonucléase A, chymotrypsinogène A, ovalbumine, sérum albumine bovine, aldolase, catalase, ferritine, thyroglobuline (Pharmacia). Les volumes d'exclusion (V_0) sont déterminés par injection de bleu dextran. Un volume de 200 μ l (0,5 mg de protéine) des fractions étudiées est injecté sur la colonne de Superose 6, un volume de 1 ml est injecté sur la colonne de Sépharose CL 6 B. Les protéines sont détectées par la mesure de la DO à 280 nm. Des fractions de 500 μ l sont recueillies et les activités glycosidasiques mesurées sur chaque fraction.

B-CHROMATOGRAPHIE SUR HYDROXYLAPATITE-ULTROGEL (IBF)

La solution enzymatique obtenue après sonnage est déposée sur une

colonne (5 x 25 cm) d'Hydroxylapatite-Ultrogel (IBF) équilibrée en tampon phosphate de sodium 20 mM pH 6,8 à 20 °C. Les débits d'injection et d'éluion sont de 150 ml/h. Après lavage par passage de 2 litres de tampon d'équilibrage, l'éluion est réalisée par un gradient discontinu en tampon phosphate de sodium pH 6,8 aux concentrations suivantes : 0,03; 0,15 et 0,3 M. Pour chacune de ces concentrations, un volume de 3 litres est injecté sur la colonne. Les protéines sont détectées par enregistrement continu de la densité optique à 280 nm. Les fractions enzymatiques recueillies (20 ml) sont rassemblées et concentrées par ultrafiltration tangentielle (cassette Minisette FILTRON Oméga 010, seuil de coupure 10.000).

C-CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS SUR MONO Q

Cette chromatographie est réalisée en FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) sur une colonne (0,5 x 5 cm) Mono Q HR 5/5 (PHARMACIA) équilibrée en tampon phosphate de sodium 0,02 M pH 6,8 à 20 °C, à un débit de 45 ml/h. Après injection de la fraction obtenue sur Hydroxylapatite Ultrogel (maximum 15 mg de protéines par injection) et lavage de la colonne par le tampon d'équilibrage, on applique un gradient continu de NaCl de 0 à 0,5 M en tampon phosphate de sodium 20 mM pH 6,8. Les protéines sont détectées par mesure en continu de la densité optique à 280 nm. Les fractions (1 ml) contenant l'activité enzymatique sont concentrées sur membrane AMICON PM 10 (seuil de coupure 10.000).

D-CHROMATOGRAPHIE D'INTERACTION HYDROPHOBE SUR OCTYL SEPHAROSE CL 4 B (PHARMACIA)

La solution enzymatique est équilibrée dans le tampon phosphate de sodium 5 mM pH 6,8 NaCl 2 M. Elle est appliquée sur une colonne d'octyl Sépharose CL 4 B (1 x 50 cm) équilibrée dans le même tampon. L'éluion est effectuée à un débit de 10 ml/h par un gradient décroissant de NaCl (de 2 M à 0) d'un volume total de 50 ml. Les fractions recueillies sont de 3 ml. L'activité est dosée sur chaque fraction. Les protéines sont repérées par mesure de la densité optique à 280 nm.

V-ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE

A-ELECTROPHORESE EN CONDITIONS DENATURANTES

Les électrophorèses (plaques de 10 x 13 cm) sont réalisées en présence de SDS à la concentration de 0,1 p.100 selon la méthode de WEBER et OSBORN (1969). Le gel utilisé pour suivre la purification est un gradient 5 - 15 p.100 en polyacrylamide.

Les échantillons sont traités par un tampon contenant du SDS (BDH) à 2 p.100 et du β -mercaptoéthanol à 4,5 p.100 à 100 °C pendant 5 minutes en présence de Bleu de bromophénol. Des dépôts allant jusqu'à 50 μ l (afin d'obtenir une quantité voisine de 0,1 mg de protéine) sont réalisés. L'électrophorèse est réalisée sous courant constant de 40 mA jusqu'à ce que le marqueur (Bleu de bromophénol) ait migré jusqu'au bas du gel.

Les échantillons traités sont, après migration, révélés par le Bleu de coomassie R 250.

La détermination de la masse moléculaire a été effectuée en gel homogène de 10 p.100 en acrylamide. Les témoins utilisés sont ceux du "kit" PHARMACIA de calibration de masse moléculaire (14.000 - 94.000).

B-ELECTROPHORESE EN CONDITIONS NON DENATURANTES

Ce type d'électrophorèse est effectué dans les mêmes conditions que l'électrophorèse dénaturante mais en supprimant dans le gel le SDS et dans le tampon-échantillon le SDS et le B-mercaptoéthanol.

C-TRANSFERT DES PROTEINES ET REVELATION DES PROTEINES APRES TRANSFERT

Le transfert se fait sur feuille de nitrocellulose selon la méthode de BURNETTE (1981). On met en contact la feuille de nitrocellulose et le gel d'électrophorèse. On dépose ensuite le tout dans une cuve de transfert contenant du tampon TRIS/HCl 0,025 M pH 8,4. On applique alors un courant continu de 15 mA de 40 volts durant 16 heures. Les dépôts ont été réalisés en double exemplaire ce qui permet, après transfert, de découper la feuille de nitrocellulose en deux parties : une moitié de la feuille servira à révéler l'activité enzymatique, l'autre à révéler les

protéines par l'Amido schwartz.

Pour révéler l'activité, on réalise un gel d'agarose (indubiose IBF) à 5 p.100 dans lequel on incorpore du méthylumbelliféryl N-acétylneuraminate à une concentration finale de 0,1 mM. Ce substrat est dilué dans le tampon optimal de l'activité. On rince la feuille de nitrocellulose par le tampon optimal de réaction et on l'applique sur le gel d'agarose. Le tout est placé à 37 °C pendant une heure, puis dans une chambre saturée en ammoniacque pendant 10 minutes. La présence de l'activité est révélée sous une lampe à 354 nm. La quantité d'enzyme à déposer dans ces conditions pour révéler l'activité est de 5 unités. Les profils respectifs des protéines et de l'activité enzymatique après migration sont réalisés par lecture au densitomètre BIORAD modèle 620.

VI-ETUDE DES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

A-DETERMINATION DE LA MASSE MOLECULAIRE PAR CHROMATOGRAPHIE DE TANSISAGE MOLECULAIRE

La masse moléculaire a été déterminée par chromatographie sur une colonne (1 x 30 cm) de Superose 6 HR 10/30 (PHARMACIA), ayant une zone de linéarité de 5.000 à 1.000.000, dans le système FPLC. La colonne est équilibrée dans un tampon phosphate de sodium 100 mM, NaCl 1 M, pH 6,8 à un débit de 0,5 ml/min. et à 20 °C. La colonne est calibrée avec les protéines suivantes : sérum albumine bovine (monomérique et dimérique), aldolase, catalase et ferritine. Le volume d'exclusion (ou V_0) est déterminé par injection de Bleu Dextran. La fraction étudiée est injectée par aliquotes de 0,2 ml au même débit. Les protéines sont détectées par mesure de la densité optique à 280 nm. Des fractions de 0,5 ml sont recueillies et l'activité enzymatique mesurée sur chacune d'entre elles.

B-DETERMINATION DU POINT ISOELECTRIQUE PAR CHROMATOFOCALISATION

Le point isoélectrique a été déterminé en FPLC sur colonne PHARMACIA Mono P HR 5/20 (0,5 x 20 cm). La colonne est équilibrée en tampon TRIS/HCl 25 mM pH 6,3. L'élution est effectuée par passage de "polybuffer 74" dilué au 1/10 et ajusté à pH 3,5 par addition d'HCl 1 M.

500 µl de fraction protéique stabilisée dans le tampon d'équilibrage sont injectés à un débit de 30 ml/h. Les protéines sont détectées par mesure de la densité optique à 280 nm. L'activité enzymatique et le pH sont mesurés sur chaque fraction (1 ml) recueillie.

VII-ETUDE DES PROPRIETES ENZYMATIQUES

A-DETERMINATION DU pH OPTIMAL

Le pH optimal a été déterminé selon le protocole décrit page 53 en utilisant le système tampon citrate/phosphate/borate 100 mM qui couvre une gamme de pH allant de 3,0 à 10. Un témoin-substrat a été incubé dans les mêmes conditions.

1-SOLUTION STOCK DE TAMPON CITRATE PHOSPHATE BORATE :

-Acide citrique cristallisé 1 H ₂ O RP	34,67 g
-Acide orthoborique RP	10,20 g
-Acide phosphorique RP	11,66 ml
-Soude 5 M	343 ml

Les acides citrique et orthoborique sont d'abord dissous dans 500 ml d'eau milliQ, puis on ajoute l'acide phosphorique et la soude 5 M. Le volume de la solution est ensuite ajusté à un litre par addition d'eau milliQ. La préparation est à une concentration de 0,165 M.

2-TAMPON CITRATE PHOSPHATE BORATE 0,1 M :

A 20 ml d'eau milliQ on ajoute 60 ml de solution stock. Le pH désiré est ajusté par addition d'acide chlorhydrique 12 M, et la solution est ensuite amenée à 100 ml par addition d'eau milliQ.

B-DETERMINATION DE LA TEMPERATURE OPTIMALE D'ACTION

L'activité est mesurée dans les conditions standard décrites à la

page 53. Les incubations sont réalisées à des températures variant de 37°C à 55°C.

C-STABILITE A LA TEMPERATURE

La stabilité à la température est réalisée en préincubant les solutions enzymatiques à différentes températures comprises entre 37°C et 55°C durant des temps variant de 7 minutes à 4 heures. Les résultats sont exprimés en logarithme décimal du pourcentage de l'activité résiduelle.

D-DETERMINATION DU K_m ET V_{max}

Les paramètres apparents K_m et V_{max} sont déterminés selon la méthode de LINEWEAVER et BURK (1934).

Le K_m et le V_m ont été déterminés sur le 4 méthyl-umbelliféryl acide neuraminique selon le protocole décrit à la page 53, avec des concentrations finales en substrat de 0,025 à 0,25 mM dans le système-tampon acétate de sodium 0,2 M pH 5,3 à 50 °C pendant 10 minutes.

Nous avons également étudié cette activité sur le sialyl (α 2-3) lactose, le sialyl (α 2-6) lactose et l'acide colominique. Ces substrats sont dilués dans le tampon acétate de sodium 0,2 M pH 5,3 à 2 mg/ml. 200 μ l de solution enzymatique sont préincubés avec 400 μ l de tampon puis 200 μ l de substrat sont ajoutés. Les temps d'incubation sont de 1h40, 3h20, 6h40 et 23h20. La quantité d'acide sialique libérée est mesurée par la méthode de WARREN (1959).

E-DETERMINATION DU K_i VIS-A-VIS DE L'ACIDE SIALIQUE

Le K_i est déterminé en préincubant la neuraminidase pendant 10 minutes en présence de différentes concentrations d'acide sialique. Les dosages sont ensuite réalisés dans les conditions standard.

VIII-ACTION D'EFFECTEURS SUR L'ACTIVITE α -D-NEURAMINIDASIQUE

Les différents cations $MnCl_2$, $CoCl_2$, $CaCl_2$, $MgCl_2$, $ZnCl_2$ et $CuSO_4$

sont incorporés dans les différents milieux réactionnels à une concentration finale de 2 mM. Il en est de même pour l'EDTA. La réaction enzymatique n'est plus arrêtée par du carbonate de sodium mais par du tampon Glycocolle/NaOH 0,2 M pH 10. La solution enzymatique est préincubée pendant 30 minutes avec le tampon optimal contenant les différents cations, puis le substrat est ajouté pour déclencher la réaction.

RESULTATS

I-CARACTERISTIQUES DE LA SOUCHE *BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM* AA/22

A-DETERMINATION DU GENRE BACTERIEN :

1-PRINCIPALES CARACTERISTIQUES :

La souche AA/22 est un bacille gram +, anaérobie strict. Elle possède bien les caractéristiques qui permettent de la différencier des genres voisins des *Bifidobacterium* (Tableau XIV). De plus, le dosage de la fructose 6 phosphate phosphocétolase est positif.

2-OBSERVATIONS MICROSCOPIQUES :

L'observation en microscopie optique d'une culture en milieu liquide sur BCC, nous montre des bâtonnets courbes non sporulés qui ne sont pas associés en colonies. En microscopie électronique (Figure 4 p.64) on observe que certains de ces bâtonnets portent des protubérances distales et l'on note la présence de formes branchues ou en "Y".

3-CONCLUSION :

La morphologie de la souche AA/22 ainsi que ses caractéristiques phénotypiques montrent que nous sommes en présence d'une espèce bactérienne appartenant au genre *Bifidobacterium*.

B-CARACTERISATION DE L'ESPECE :

1-DETERMINATION DE L'ESPECE :

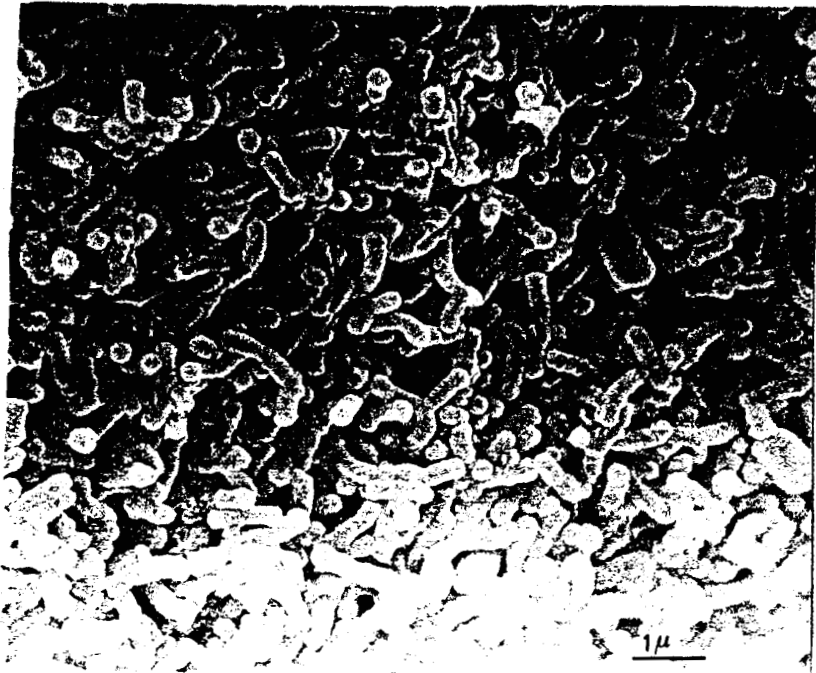
La détermination de l'espèce a été faite en utilisant les critères donnés par MITSUOKA (1984). Les résultats rassemblés dans le tableau XV page 65 montre que la souche AA/22 possède bien les capacités fermentaires caractéristiques de l'espèce *B. bifidum*.

Cette souche est capable d'utiliser les facteurs glucidiques du

TABLEAU XIV : DETERMINATION DU GENRE DE LA SOUCHE AA/22

	Bifidobacterium critères de Mitsuoka (1984)	Souche A-A/2-2
Présence de gaz sur glucose	-	-
Catalase	-	-
Réduction des nitrates	-	-
Production d'indole	-	-
Liquéfaction de la gélatine	-	-
Acidification des milieux contenant du Rhamnose	-	-
Sorbose	-	-
Erythritol	-	-
Adonitol	-	-
Galactitol	-	-

- Test négatif



X 5000



X 40 000

Figure 4: CELLULES DE *B. BIFIDUM* AA/22 EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

TABLEAU XV : FERMENTATION DES SUCRES DE LA SOUCHE AA/22

	B. bifidum critères de Mitsuoka (1984)	B. bifidum AA/22
Gluconate	-	-
Ribose	-	-
Arabinose	-	-
Lactose	+	+
Cellobiose	-	-
Mélézitose	-	-
Saccharose	-	+
Sorbitol	-	-
Amidon	-	-

- pas de fermentation.

+ fermentation positive.

lait de Femme et est sensible à l'action de la N-acétyl-D-glucosamine (Tableau XVI p.67).

La souche AA/22 est donc un *Bifidobacterium bifidum* variant b.

2-COMPARAISON AVEC LA SOUCHE TYPE :

La souche DSM 20.456 est donnée comme étant une souche type de *B. bifidum*, il est pour cela intéressant de comparer les potentialités enzymatiques de ces deux souches.

a-Galerie Api 50 CH :

L'étude de la fermentation des sucres a été effectuée sur ce type de galerie qui constitue un moyen commode d'identification que nous utiliserons ensuite systématiquement pour contrôler l'état des cultures en sortie de fermenteur. Les résultats (Tableau XVII p.68) concordent avec ceux obtenus précédemment lors de l'étude de la fermentation des sucres en tubes. Il faut noter que sur ce type de galerie les premiers signes de dégradation des sucres n'apparaissent qu'au bout de 72 heures alors qu'en tubes les mêmes résultats sont obtenus après 48 heures de culture.

La souche AA/22 fermente lentement le galactose, le résultat positif n'est obtenu qu'après 5 jours de culture. Contrairement à la souche type, la souche AA/22 ne fermente pas le mélibiose mais utilise le β -gentiobiose, le D-turanose et le saccharose, bien que ces deux derniers sucres ne commencent à être dégradés qu'au bout de respectivement 10 et 8 jours.

Ces résultats montrent la difficulté de préciser pour certaines souches, uniquement à partir des caractéristiques fermentaires, l'appartenance au biotype b isolé chez l'enfant. Ces biotypes doivent fermenter le mélibiose et non le saccharose. La souche AA/22 fermentant le saccharose et ne fermentant pas le mélibiose nous ne pouvons pas préciser s'il s'agit d'un variant a ou b. C'est pourquoi l'étude de l'influence des facteurs glucidiques est nécessaire. Ces résultats sont décrits dans le mémoire de thèse de M.B. ROMOND (1988) (Tableau XVI p.67).

TABLEAU XVI : SENSIBILITE DE LA SOUCHE AA/22 A CERTAINS FACTEURS BIFIDIGENES
(D'APRES ROMOND - 1987)

	Lait U/ml		Gynolactose U/g	éthyl N acétyl glucosaminide U/g	Mucine U/g
	Vache	Femme			
B. bifidum AA/22	< 12,5	162,5 ± 37,5	22 200 ± 288	187 500 ± 62 500	3 750 ± 250

1 unité = inverse de la dernière dilution du facteur envisagé permettant la croissance de la bactérie.

**TABEAU XVII : FERMENTATION DES SUCRES SUR Api 50 CH DES SOUCHES
DE B. bifidum - DSM 22 456 ET AA/22**

	DSM 22 456	AA/22
Glycérol	-	-
Erythritol	-	-
D-arabinose	-	-
L-arabinose	-	-
Ribose	-	-
D-xylose	-	-
Galactose	+	+
D-glucose	+	+
D-fructose	+	+
D-mannose	-	-
Rhamnose	-	-
Dulcitol	-	-
Mannitol	-	-
Alpha-méthyl-D -manonoside	-	-
N acétyl glucosamine	-	-
Cellobiose	-	-
Lactose	+	+
Mélibiose	+	-
Saccharose	-	+
Tréhalose	-	-
Mélézitose	-	-
Beta gentiobiose	-	+
D-turanose	-	+
D-fucose	-	-
L-fucose	-	-

+ dégradation du substrat

- pas de dégradation du substrat

b-Activités enzymatiques :

L'utilisation de galeries Api-zym nous a permis de donner un large spectre qualitatif des activités enzymatiques présentes chez ces souches (Tableau XVIII p.70). La lecture effective après 12 heures d'incubation nous montre que la souche AA/22 possède 16 des 19 activités enzymatiques testées.

De plus, la recherche d'activités glycosidasiques détectées sur substrats synthétiques de type para nitrophenyl ou méthyl umbelliferryl (Tableau XIX p.71) complète les résultats obtenus sur galerie Api-zym. On caractérise plus particulièrement au niveau cellulaire:

- une α -D-galactosidase,
- une β -D-galactosidase,
- une α -D-glucosidase,
- une β -D-glucosidase,
- une N-acétyl- β -D-glucosaminidase,
- une N-acétyl- β -D-galactosidase,
- une α -L-fucosidase,
- une α -D-neuraminidase.

La souche type a un potentiel enzymatique moins étendu, et nous n'avons pas mis en évidence d'activité α chymotrypsine et de N-acétyl- β -D-glucosaminidase.

Il apparaît d'autre part une différence au niveau de la détection de la β -D-glucosidase entre les résultats obtenus en tubes sur para nitrophenyl- β -D-glucopyrannoside qui donne un résultat négatif et la galerie Api-zym qui utilise comme substrat le 6 bromo 2 naphtyl- β -D-glucopyrannoside et qui donne un résultat positif. Cette différence peut s'expliquer par la similitude des substrats utilisés dans la galerie Api-zym. En effet cette technique nécessite des temps d'incubation longs (10h), ce qui peut introduire des interférences au niveau des résultats. Cette hypothèse est confirmée par le fait que la présence de β -D-glucosidase est décelée dans des quantités plus faibles et en fin d'incubation. Il faut aussi souligner que la mise en évidence de l' α -L-fucosidase n'a été possible qu'en utilisant des substrats naturels.

Enfin, nous avons vérifié quelles étaient les enzymes excrétées: seule la β -D-galactosidase, la N-acétyl- β -D-glucosaminidase, l' α -D-neuraminidase et l' α -L-fucosidase se retrouve en quantité suffisante pour

**TABEAU VIII : ACTIVITES ENZYMATIQUES DETERMINEES SUR GALERIE
Api-Zym DES SOUCHES DE Bifidobacterium
DSM 22 456 ET AA/22 APRES 4 h. D'INCUBATION**

	DSM 22 456	AA/22
Phosphatase alcaline	+	+
Estérase C 4	+	+
Estérase lipase C 8	-	-
Lipase C 14	+	+
Leucine arylamidase	-	-
Valine arylamidase	+	+
Cystine arylamidase	-	-
Trypsine	+	+
α -chymotrypsine	-	+
Phosphatase acide	+	+
Naphtol-AS-BI- phosphorylase	+	+
α -galactosidase	+	+
β -galactosidase	+	+
β -glucuronidase	+	+
β -glucosidase	+	+
α -glucosidase	+	+
N acétyl- β -D- glucosaminidase	-	+
α -mannosidase	-	-
α -fucosidase	-	-

+ test positif, présence de l'enzyme
- test négatif

TABLEAU XIX : ACTIVITES GLYCOSIDASIQUES DE *B. bifidum*AA/22

	Cellule entière	Enzymes excrétées	Cellule traitée à la presse de French
α Galase	+	-	+
β Galase	+	+	+
α Glcase	+	-	+
β Glcase	-	-	-
α Manase	-	-	-
β Manase	-	-	-
α Fucase *	+	+	+
α Fucase	-	-	-
α GlcNacase	-	-	-
β GalNacase	+	-	+
β GlcNacase	+	+	+
α NeuAcase	+	+	+

* = Résultats obtenus en utilisant un substrat naturel (substance H).

Enzymes excrétées : recueillies au niveau du milieu de culture après centrifugation des cellules.

pouvoir être détectées au niveau du milieu de culture.

Nous avons quantifié les activités qui nous intéressent plus particulièrement au niveau des cellules "entières" et des cellules après passage à la presse de FRENCH (Tableau XX p.73). On remarque que les activités enzymatiques sont beaucoup plus élevées pour la souche AA/22. Nous obtenons en particulier dans le cas des cellules intègres :

- une activité β Gal^{***} 2 fois plus importante,
- une activité β GlcNAc^{***} 6 fois plus importante,
- une activité NeuAc^{***} 7 fois plus importante,
- une activité Fuc^{***} 10 fois plus importante.

Après passage à la presse de FRENCH seules les activités β -D-Gal^{***} et α -L-Fuc^{***} sont significativement augmentées.

II-OPTIMISATION DE LA PRODUCTION D'ENZYMES

A-INTRODUCTION :

La mesure des activités au niveau des cellules dont nous avons détruit la structure soit par passage à la presse de FRENCH soit par traitement aux ultra-sons montre que nous pouvons ainsi accéder à une plus grande quantité d'enzymes (Tableau XXI p.74), à l'exception de l'activité NeuAc^{***} qui reste sensiblement constante quelque soit le traitement; pour cette activité, les différences observées peuvent être attribuées à la dénaturation de l'enzyme lors de l'extraction. D'autre part, nous avons comparé l'efficacité d'un traitement aux ultra-sons avec un traitement à la presse de FRENCH, dans le premier sans en avoir optimiser les conditions nous retrouvions dans la suspension cellulaire la même quantité de Gal^{***} et de NeuAc^{***}, deux fois plus de GlcNAc^{***} et 2 fois plus de Fuc^{***}. Cette augmentation peut s'expliquer soit par le fait que les ultra-sons détruisent les membranes bactériennes et permettent à une certaine fraction d'activité enzymatique de s'exprimer, soit que pour la même quantité de protéines enzymatiques leur activité augmentent à cause de la modification de l'environnement.

De plus nous constatons que les activités enzymatiques sont très

TABLEAU XX : ACTIVITE ENZYMATIQUE (U/g DE MATIERE SECHE) DES SOUCHES DSM 22 456 ET AA/22 DE BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM

CELLULES EN SUSPENSION				
	Galactosidase	N-acétyl- β -D. glucosaminidase	Neurami- nidase	Fucosi- dase
DSM 22 456	300	50	10	2
AA/22	630	300	88	23
* PRESSE DE FRENCH				
	Galactosidase	N-acétyl- β - D. glucosaminidase	Neurami- nidase	Fucosi- dase
DSM 22 456	560	40	8	7,5
AA/22	1 350	250	66	80

*: Suspension cellulaire après traitement à la presse de French.

**TABLEAU XXI : ACTIVITE EXOGLYCOSIDASIQUE DE LA SOUCHE DE B. bifidum
AA/22 (U/g DE CELLULE SECHE)**

		Galase	GlcNacase	NeuAcase	Fucase
Souche AA/22	Cellules entières	634	300	88	20
	Surnageant de culture	70	24	10	5
	Extraction à la presse de French (1)	1 350	250	66	90
	Extraction aux ultra-sons (1)	1 700	510	80	170

Culture des souches en fermenteur à 37°C sous atmosphère N₂/CO₂ sur milieu 37 g/l de BCC - 10 g/l de glucose.

(1):Les activités sont mesurées sur la suspension cellulaire après traitement .

faiblement excrétées puisque dans le surnageant de culture nous ne retrouvons, par rapport à une solution traitée aux ultra-sons, que 5 p.100 de Gal^{***}, 5 p.100 GlcNAc^{***}, 13 p.100 de Neu^{***} et 3 p.100 de Fuc^{***}. Les activités glycosidasiques dont nous voulons optimiser la production sont donc des activités cellulaires et l'extraction aux ultra-sons associée à la mesure de ces activités dans l'homogénat obtenu est un bon reflet de l'activité potentielle des cellules de *Bifidobacterium bifidum*. Les activités excrétées sont cependant également à étudier car elles sont des témoins de l'état de la culture puisqu'on peut voir leur apparition lors d'une autolyse. D'autre part, si en optimisant la production de ces activités enzymatiques on augmente significativement les quantités d'enzymes recueillies, celles ci sont généralement plus faciles à purifier.

Dans un premier temps les études ont été menées après culture (20 ml de milieu) en flacon de type pénicilline; l'extraction aux ultra-sons a été effectuée sur 0,01 g de matière sèche cellulaire durant deux minutes dans un tampon phosphate de sodium 20 mM pH 7,0. Les principaux résultats ont été ensuite confirmés par culture en fermenteur ce qui nous a permis de procéder à des extractions sur 4 g de matière sèche.

B-DETERMINATION D'UN pH OPTIMUM :

Bifidobacterium bifidum en anaérobiose produit des acides organiques qui vont inhiber la croissance du microorganisme. La recherche d'un pH optimal de culture en flacon de pénicilline nous a amené à effectuer les cultures à pH constant en utilisant trois systèmes tampons:

- _ le tampon MOPS 50 mM entre pH 6,5 et 8
- le tampon PIPES 50 mM entre pH 6 et 7,5
- le tampon phosphate de Na 50 mM entre pH 5 et 8

Les forces ioniques des tampons ont permis de compenser la production d'acide organique durant les 60 heures de culture sur un milieu contenant 5 g/l de BCC.

1-INFLUENCE DU pH SUR LA PRODUCTION DE BIOMASSE :

Les résultats obtenus (figure 5 p.76) avec les trois systèmes

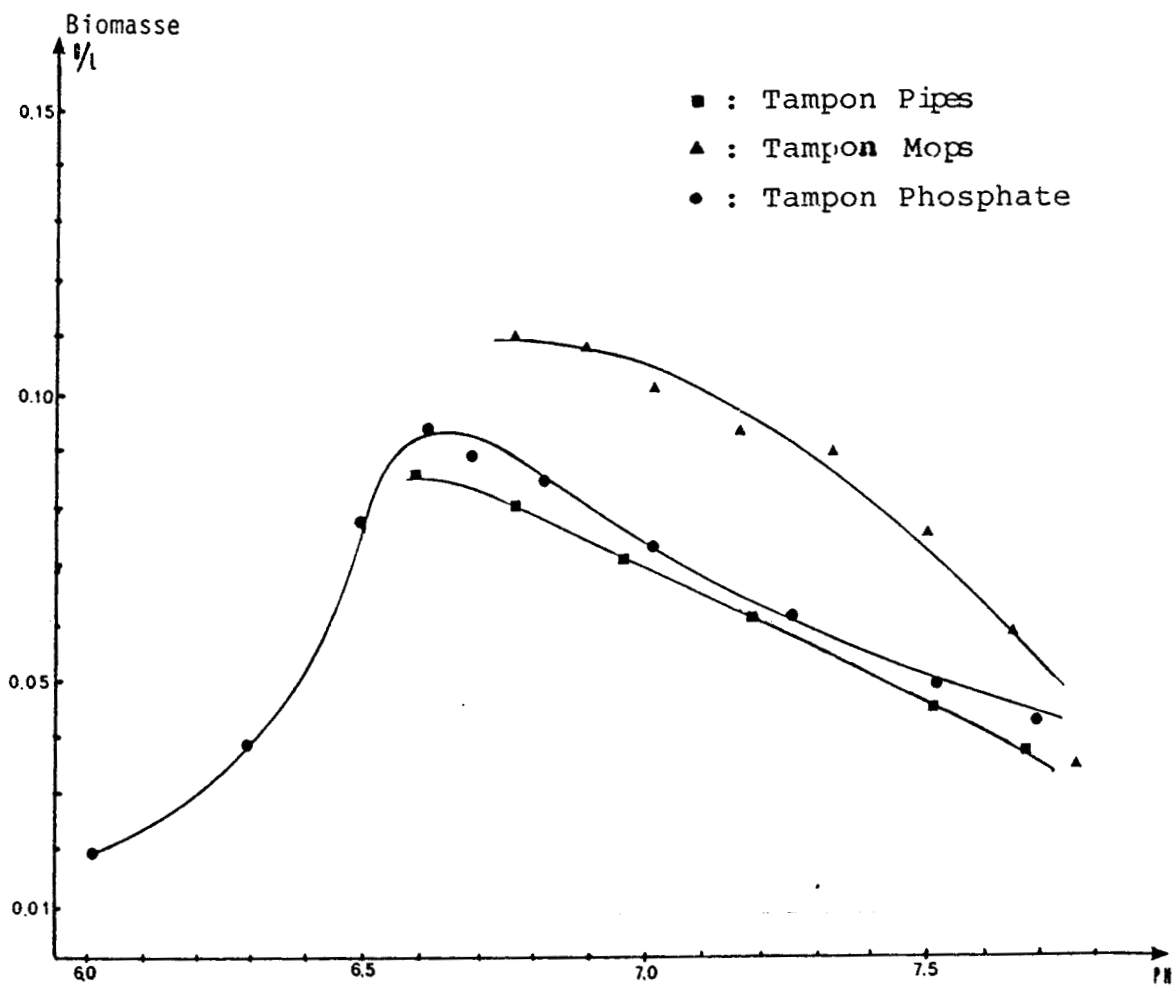


FIGURE 5 : Influence du pH du milieu de culture sur la production de biomasse chez B. bifidum AA/22.

tampons utilisés sont homogènes et permettent de définir un optimum de culture pour des pH compris entre 6,6 et 6,8. De part et d'autre de cet optimum la biomasse de *Bifidobacterium bifidum* décroît d'abord lentement, nous obtenons 50 p. 100 de la quantité de cellules recueillies à pH 6,8 pour un pH de 6 et de 8. Ensuite pour des pH plus acides la croissance est très limitée puisque pour des pH de culture de 5,5 et 5 nous obtenons respectivement 15 et 10 p. 100 de la biomasse obtenue à pH 7.

La quantité de cellules de *B. bifidum* AA/22 obtenue à l'optimum de pH est selon le système tampon comprise entre 0,85 et 1,2 g de matière sèche par litre de culture; les meilleurs résultats sont obtenus en tampon MOPS.

2-INFLUENCE DU pH SUR LA PRODUCTION D'ENZYMES :

a-Influence du pH sur les activités glycosidasiques exocellulaires :

Pour les trois activités glycosidasiques mesurées le maximum d'activité excrétée se trouve pour des pH compris entre 6,6 et 6,8 et ce dans les trois systèmes tampons utilisés (Fig.6 p.78). De plus pour les trois activités le tampon PIPES favorise leur excrétion; c'est ainsi que nous obtenons à pH 6,7 :

- $3,5 \cdot 10^{-3}$ U de Gal^{***},
- $1,0 \cdot 10^{-3}$ U de GlcNAc^{***},
- $0,28 \cdot 10^{-3}$ U de NeuAc^{***}

pour un gramme de matière sèche cellulaire.

La variation de l'excrétion des trois enzymes est sensiblement identique en fonction du pH et pour des valeurs de pH de 7,5 et 6, on obtient 5 fois moins d'enzymes dans le milieu de culture.

b-Influence du pH sur les activités cellulaires :

Nos résultats (Fig.7 p.79) sont exprimés en unités par gramme de matière sèche de *B. bifidum* AA/22 et représentent donc bien l'influence du pH sur l'expression des activités glycosidasiques dans les cellules bactériennes.

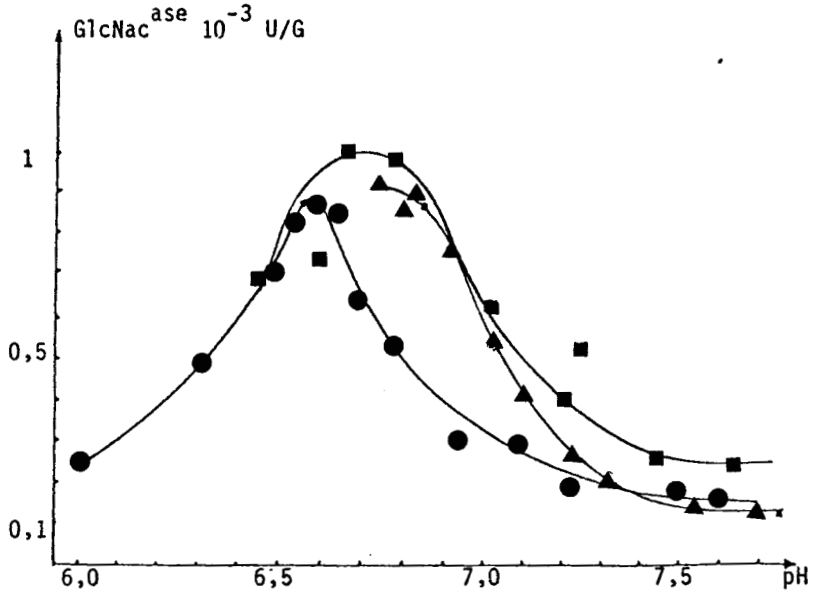
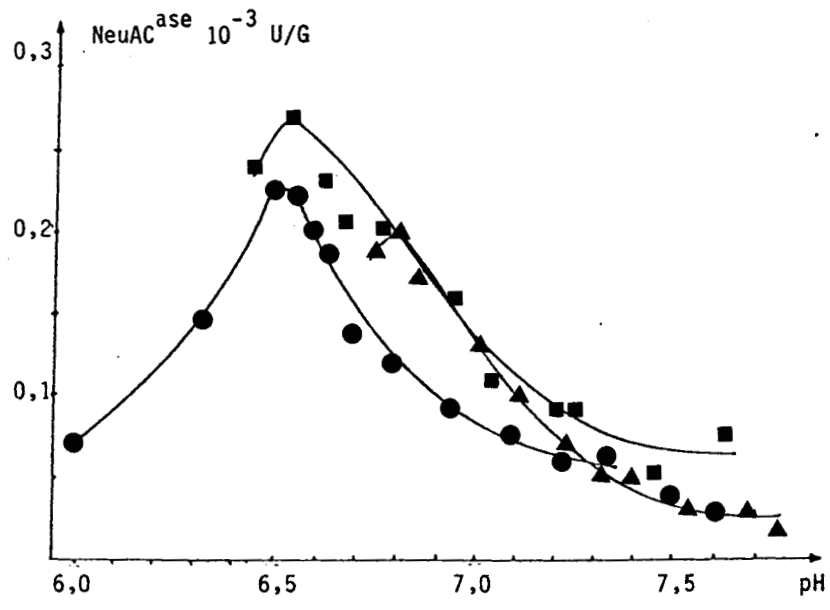
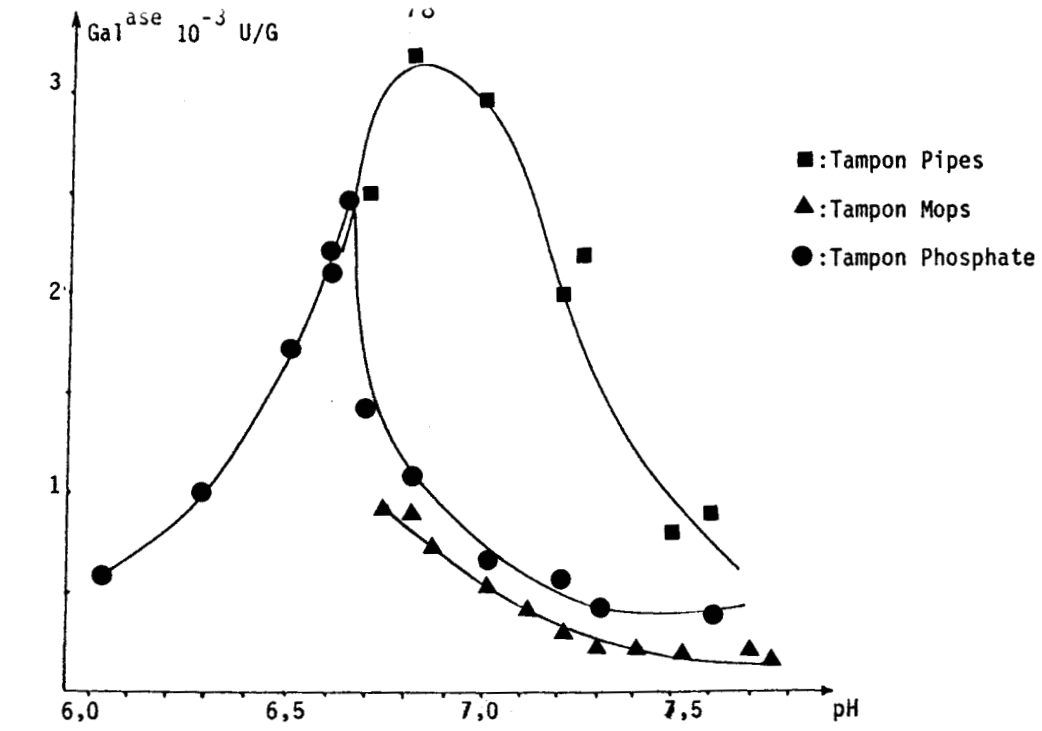


Figure 6 : Influence du pH du milieu de culture sur la production de glycosidases excrétées chez *B. bifidum*.

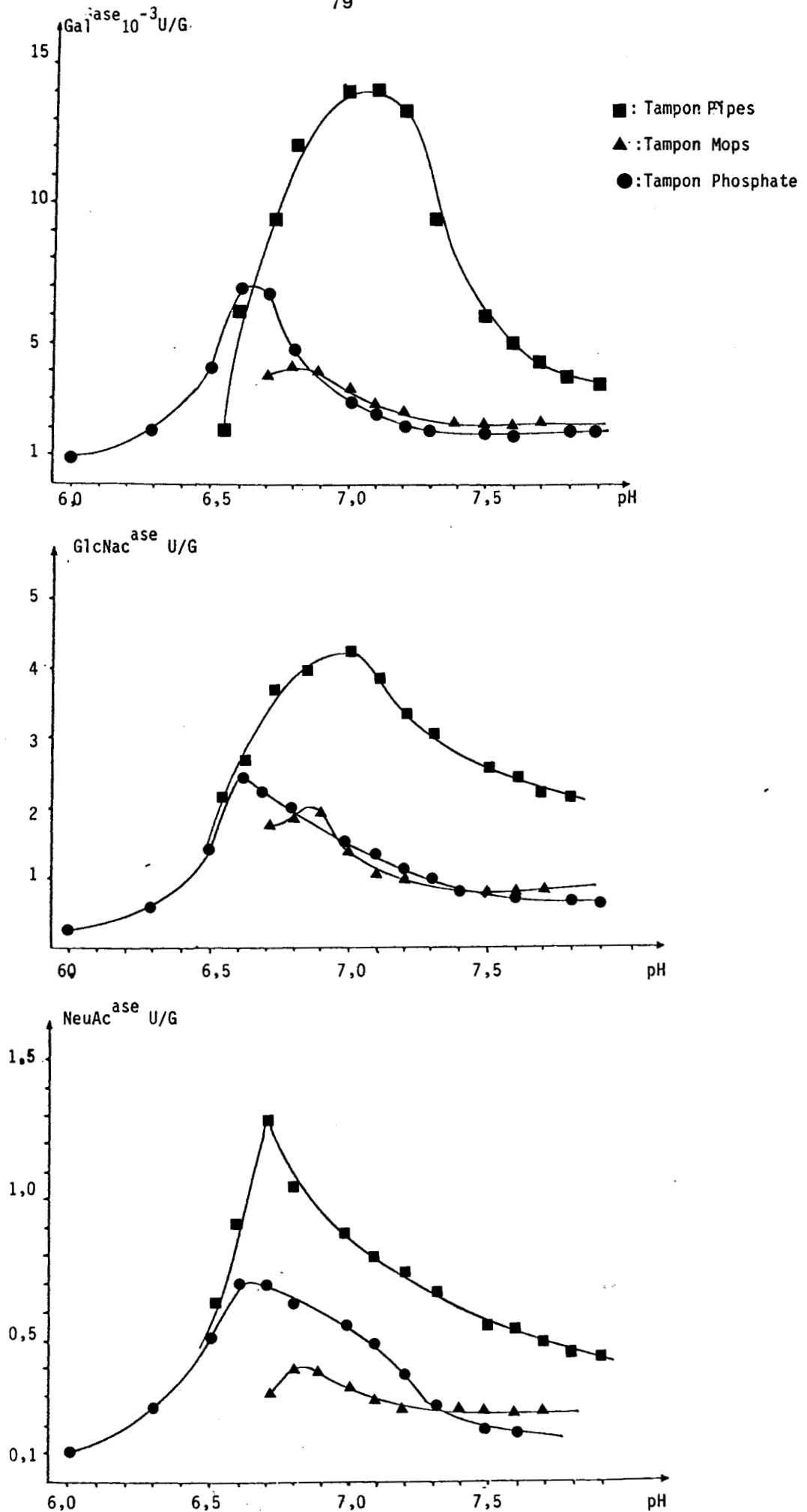


Figure 7 : Influence du pH du milieu de culture sur la production de glycosidases cellulaires chez B.bifidum AA/22.

Selon les systèmes tampons utilisés nous obtenons des pH optimum différents mais compris entre 6,6 et 7. Cependant dans un même système tampon les pH optimaux sont les mêmes pour les trois activités glycosidasiques :

- le tampon PIPES donne les activités cellulaires les plus fortes, le pH optimum est de 7,0 et nous obtenons pour un gramme de matière sèche 14.10^{-3} U de Gal^{***}, $4,3.10^{-3}$ U de GlcNAc^{***} et $1,3.10^{-3}$ U de NeuAc^{***}.
- en tampon phosphate de sodium le pH optimum est de 6,6
- en tampon MOPS le pH optimum est de 6,8.

Quelque soit le système tampon utilisé la quantité d'activité glycosidasique cellulaire varie de la même façon en fonction du pH. Les concentrations cellulaires en enzymes sont très faibles pour des pH supérieurs à 7,3 et inférieurs à 6,5. Au delà de ces pH, les concentrations en enzymes sont 4 fois plus faibles.

3-CONCLUSION :

Cette étude nous permet donc de déterminer le pH qui nous donnera la plus grande quantité d'enzymes par volume de culture. Le pH optimum de production de biomasse et des trois enzymes étant proche, le maximum d'activités enzymatiques par litre de culture est obtenu pour un pH voisin de 6,8. Pour des raisons de coûts, les études de milieu de culture, en flacon pénicilline, seront effectuées en tampon phosphate de sodium 20 mM pH 6,8.

D'autre part, cette étude de l'influence du pH sur les activités étudiées n'a pas permis de trouver de conditions provoquant l'excrétion enzymatique. Les enzymes cellulaires restent dans tous les cas quatre fois supérieures aux activités excrétées.

Les variations d'activité et d'optimum de pH selon les systèmes tampons ne sont pas explicables. Il est cependant intéressant de noter que le tampon MOPS, qui donne 20 p.100 de biomasse supplémentaire par rapport aux deux autres tampons, n'est pas favorable à une production importante d'enzymes cellulaires et de Gal^{***} extracellulaire.

C-DETERMINATION D'UN MILIEU MINIMUM :

La méthode statistique employée a permis d'étudier l'influence de

la concentration de différents éléments :

- le bouillon cerveau - cœur (BCC),
- le glucose,
- des minéraux (magnésium, manganèse et cobalt).

Les résultats obtenus (Tableau XXII p.82) sont des moyennes et ne peuvent être utilisés qu'à titre comparatif.

1-PRODUCTION DE BIOMASSE :

Les conditions optimales pour la production de cellules de *B. bifidum* AA/22 sont les suivantes :- une concentration en BCC de 37 g/l,

- une concentration en glucose de 10 g/l,
- une concentration de 5 mM en Mg^{2+} , Mn^{2+} et de Cu^{2+} .

2-PRODUCTION D'ENZYMES :

La production d'enzymes cellulaires ou excrétées dans le milieu est meilleure pour de fortes concentrations en BCC ainsi qu'en glucose. Par contre l'addition de minéraux n'augmente pas cette production et a même tendance à l'inhiber.

3-CONCLUSION :

L'utilisation d'un milieu riche en élément nutritif (BCC) et en glucose favorise non seulement la croissance cellulaire mais également la production au niveau cellulaire des glycosidases. Si les minéraux favorisent la croissance ils sont par contre inhibiteurs de la production des enzymes.

D-INFLUENCE DES FACTEURS BIFIDIGÈNES :

A partir d'un milieu faiblement concentré en nutriments (BCC 5 g/l) nous avons incorporé différentes sources de facteurs bifidigènes afin de mieux observer leur influence sur la production d'enzymes et la

**TABLEAUXII : ACTIVITE EXOGLYCOSIDAQUE DE B. bifidum AA/22 (U/l de culture)
(SELON LA METHODE STATISTIQUE DE AUDEN ET COLL.) (1967)**

INFLUENCE - DU BOUILLON CERVEAU COEUR (BCC)
- DU GLUCOSE
- DES MINERAUX Mn²⁺ Mg²⁺ Co²⁺

	Concentration en BCC (g/l)			Concentration en glucose (g/l)			Concentration en Minéraux (mM)		
	5	20	37	0	5	10	0	2	5
Biomasse g/l	0,4	0,8	1,2	0,50	0,70	0,85	0,60	0,40	1,00
Activité dans les surnageants de culture									
Galase	11,6	14,4	18	9,25	9,75	10,22	12,9	3,2	6,0
GlcNacase	0,64	0,92	1,92	1,95	1,20	2,38	2,7	0,84	0,35
NeuAcase	0,04	0,08	0,24	0,10	0,14	0,17	0,3	0,08	0,10
Activité cellulaire									
Galase	160	248	378	225	308	318	457	228	23,0
GlcNacase	80	159	231,6	117,5	163	174	228	44	10,00
NeuAcase	0,24	0,48	0,78	0,5	0,50	0,30	1,08	0,36	0,30

croissance.

- la fraction IV de COHN qui contient des protéines glycosylées et peut donc être source de BF 1

- le gynolactose , sucre du lait de Femme source lui aussi de BF 1

- les mucines de Porc non hydrolysées: en utilisant le potentiel enzymatique du *B. bifidum* AA / 22 les mucines peuvent être source de BF 1 ou de BF 2

-le lait de Femme qui peut apporter des BF 1 et des BF 2, et du lactulose après stérilisation

-le lait de Vache contient du lactulose mais en beaucoup plus faible quantité que le lait de Femme. Sa concentration en BF 2 est cependant identique. Les cultures ont été arrêtées après 60 heures d'incubation à 37°C au cours de la phase stationnaire.

1-INFLUENCE DES FACTEURS BIFIDIGÈNES SUR LA BIONASSE :

Les résultats (Tableau XXIII p.84) montrent que tous les facteurs bifidigènes augmentent la croissance de *B. bifidum* AA/22, et elle est d'autant plus importante que la concentration en facteurs bifidigènes augmente. Cependant deux remarques sont à faire :

Premièrement, nous n'observons pas pour la fraction IV de COHN, le gynolactose et la mucine une croissance des bactéries proportionnelle à la concentration en ces facteurs bifidigènes potentiels. Ces augmentations de croissance sont en outre assez faibles (inférieures à 25 p.100). Ceci entraîne deux conclusions: ces facteurs ne sont pas de simples substrats énergétiques puisque la croissance de la souche *B. bifidum* semble dans les conditions où nous l'avons effectuée se stabiliser à des concentrations supérieures à 3 g/l; le milieu utilisé est alors soit déficient en un autre facteur de croissance et pas assez riche pour permettre de visualiser un effet dose des facteurs bifidigènes, soit la croissance est inhibée par un autre paramètre, le pH ne pouvant être incriminé puisque nous avons dans tous les cas vérifié qu'il ne s'était pas éloigné de la valeur optimale.

Deuxièmement pour le lait de Femme les augmentations sont proportionnelles à la quantité de lait introduite et le gain de croissance est beaucoup plus important (plus 100 p.100 pour une concentration de 5 g/l). Ces

TABLEAU XXIII : INFLUENCE DE LA FRACTION IV DE COHN, DU GYNOLACTOSE, DE LA MUCINE ET DU LAIT DE FEMME SUR LA QUANTITE D'EXOGLYCOSIDASE PRODUITE PAR B. bifidum (U/g DE MATIERE SECHE)

		Fraction IV de Cohn (g/l)			Gynolactose (g/l)			Mucine (g/l)			lait de femme %			Témoin
		1	3	5	1	3	5	1	3	5	1	3	5	
Biomasse (1)		0,80	0,88	0,84	0,92	0,94	0,96	0,76	0,84	0,82	0,94	1,02	1,50	0,65
Activité dans le surnageant de culture	Gal ^{ase}	4,30	3,95	5,90	8,10	23,50	25,00	3,25	6,50	9,55	13,00	15,50	22,50	5,20
	GlcNac ^{ase}	4,20	3,85	4,65	4,05	14,60	17,00	2,15	5,25	8,65	4,30	8,55	11,55	3,80
	NeuAc ^{ase}	0,30	0,30	0,20	0,35	0,40	0,45	0,30	0,45	0,50	0,25	0,30	0,50	0,45
Activité cellulaire	Gal ^{ase}	20	26	30	65	100	90	35	45	40	53	85	95	25
	GlcNac ^{ase}	16	22	18	35	47	40	30	38	40	30	45	60	15
	NeuAc ^{ase}	0,3	0,4	0,45	0,50	0,50	0,35	0,38	0,40	0,45	0,50	0,40	0,45	0,4

- (1) g/matière sèche, incertitude sur la mesure de la biomasse 2 %
- Incertitude sur la mesure des activités enzymatiques 10 %

résultats éliminent la possibilité d'une inhibition de la croissance due au milieu BCC à 5 g/l et confirment que le lait de Femme contient bien les facteurs de croissance de *B. bifidum*.

Il est intéressant de comparer l'effet du lait de Femme et du lait de Vache sur la croissance de *B. bifidum*. En effet si le lait de Femme a un effet de simple source énergétique, il ne présentera que peu de différence avec le lait de Vache. Les résultats exposés dans le tableau XXIV page 86 montre que pour un milieu de base à 5 g/l et 37 g/l de BCC la supplémentation en lait de Femme et de Vache favorise la production de biomasse, mais de manière deux fois plus importante dans le cas de la supplémentation en lait humain. Cet effet est beaucoup plus sensible si le milieu de départ est moins riche en BCC.

En conclusion, nous avons vérifié que les facteurs bifidigènes utilisés classiquement augmentent bien la production de biomasse chez *B. bifidum* et nos résultats sont dans ce cas en accord avec ceux obtenus par C. ROMOND qui utilise la production d'acide comme mesure du métabolisme de la bactérie.

Cependant, nos résultats montrent que seul le lait humain reste le facteur de croissance le plus efficace pour *B. bifidum*, et qui dans nos conditions est un vrai facteur de croissance puisque l'augmentation de sa concentration entraîne toujours une croissance supplémentaire. Par contre, les autres sources comme le gynolactose et la mucine sont beaucoup moins efficaces alors que la sensibilité de la souche *B. bifidum* AA/22 à ces facteurs était importante.

2-INFLUENCE DES FACTEURS BIFIDIGENES SUR LA PRODUCTION D'ENZYMES :

Les résultats présentés dans les tableaux XXIII et XXIV p.84 et 86 montrent tout d'abord que la fraction IV de COHN n'a eu aucun effet sur la production des glycosidases étudiées, excrétées ou cellulaires.

D'autre part, nous n'avons pu mettre en évidence une influence nette des facteurs bifidigènes (gynolactose, mucine, lait de Femme) sur la production de la NeuAc^{***} de *B. bifidum*. Les expériences effectuées, sur un milieu contenant 5 g par litre de BCC (tableau XXIII p.84), font apparaître que les facteurs issus des mucines et de lait humain augmentent la production de Gal^{***} et de GlcNAc^{***} excrétées ou cellulaires.

TABLEAU XXIV : INFLUENCE DU LAIT DE VACHE OU DE FEMME SUR LES ACTIVITES EXOGLYCOSIDASIQUES PRODUITES PAR B. bifidum AA/22

		Milieu 5 g/l de BCC			Milieu 37 g/l de BCC 10 g/l de glucose		
		Témoin	+ 5 % lait de femme	+ 5 % lait de vache	Témoin	+ 5 % lait de femme	+ 5 % lait de vache
		Activité au niveau du surnageant U/g de cellules sèches	Gal ^{ase}	5,3	20,3	5,2	1,2
	GlcNac ^{ase}	1,5	8,1	3,1	1,1	0,9	0,5
	NeuAc ^{ase}	0,4	0,5	0,4	0,2	0,20	0,3
U/g de cellules sèches	Gal ^{ase}	28,0	89,0	32,0	18	25	20
	GlcNac ^{ase}	9,0	72,1	11,0	7,5	8,9	7,1
	NeuAc ^{ase}	0,35	0,25	0,35	0,25	0,30	0,25
Biomasse *		0,70	1,25	0,95	2,50	3,00	2,80

- * g de matière sèche/l de milieu, incertitude sur la mesure de la biomasse 2 %

- Incertitude sur la mesure des activités enzymatiques 10 %

Comme nous l'avons constaté pour la biomasse, nous n'observons une relation entre la concentration du facteur bifidigène et la production des activités enzymatiques que dans le cas de l'utilisation du lait humain. Par contre, pour des concentrations de mucine et de gynolactose supérieures à 5 g/l, nous n'observons pas d'effet sur la concentration en glycosidases. De plus, les facteurs issus du lait de Femme sont plus efficaces, en effet pour ce milieu complétement avec 5 g/l de gynolactose ou 5 p. 100 de lait de Femme, les activités β -D-galactosidasique et N-acétyl- β -D-hexosaminidasique sont multipliées par un facteur 3 ou 4, alors que l'utilisation de mucine ne fait que doubler les concentrations de ces activités enzymatiques.

Dans un deuxième temps, nous avons comparé l'efficacité du lait de Femme à celui du lait de Vache sur la production de glycosidases dans un milieu à 5 g puis 37 g par litre de BCC. Le lait de Vache constituait un bon témoin de l'efficacité du lait de Femme sur la production d'enzymes. Nous observons, premièrement que le lait de Vache n'a pas eu d'influence notable sur la production des glycosidases que nous étudions, deuxièmement nous observons que le lait humain augmente très nettement la production d'activités glycosidasiques pour une concentration en BCC de 5 g/l, les activités cellulaires β -D-gal*** et β -D-glcNAc*** étant respectivement multipliées par 3 et 7. Par contre, pour une concentration de 37 g/l de BCC, il y a peu de différences de concentration des activités excrétées et cellulaires avec le témoin ne contenant pas de lait humain.

3-CONCLUSION :

La fraction IV de COHN se révèle être un mauvais facteur de croissance et n'induit pas la production de glycosidases chez la souche de *B. bifidum* AA/22.

La production de neuraminidase ne peut être augmentée qu'en favorisant la production de la biomasse.

En outre les facteurs bifidigènes: gynolactose, mucine, lait de Femme et lait de Vache, semblent agir de deux façons sur la production de glycosidases par *B. bifidum* :

-au niveau de la multiplication cellulaire puisqu'ils permettent d'augmenter la biomasse.

-au niveau du métabolisme puisqu'ils augmentent la concentration ou la réactivité de certaines glycosidases.

La mucine de Porc n'est pas très efficace pour augmenter la production de glycosidases chez *B. bifidum* par rapport aux facteurs bifidigènes contenus dans le lait. Par conséquent, dans la suite de notre travail nous ne l'utiliserons plus.

Enfin le lait de Femme reste le facteur bifidigène le plus avantageux pour la production de glycosidases chez *B. bifidum*, mais son action est plus efficace lorsqu' on utilise un milieu contenant 5 g/l de BCC et de 5 p. 100 de lait de Femme puisque l'on obtient par litre de culture et par rapport à un milieu à 37 g/l de BCC, 10 g/l de glucose et de 5 p. 100 de lait de Femme, 1,5 fois plus de Gal^{***} et 3,3 fois plus de GlcNAc^{***}. Ce résultat est en désaccord avec l'optimisation faite pour le choix de la concentration en BCC et glucose et pour la production de neuraminidase. Cela nous conduit donc à vérifier certains paramètres en fermenteur. Les concentrations en enzyme excrétée n'ayant pu être augmentées de manière intéressante nous n'avons reporté que les valeurs obtenues sur les enzymes cellulaires.

E-PRODUCTION DE GLYCOSIDASES EN FERMENTEUR

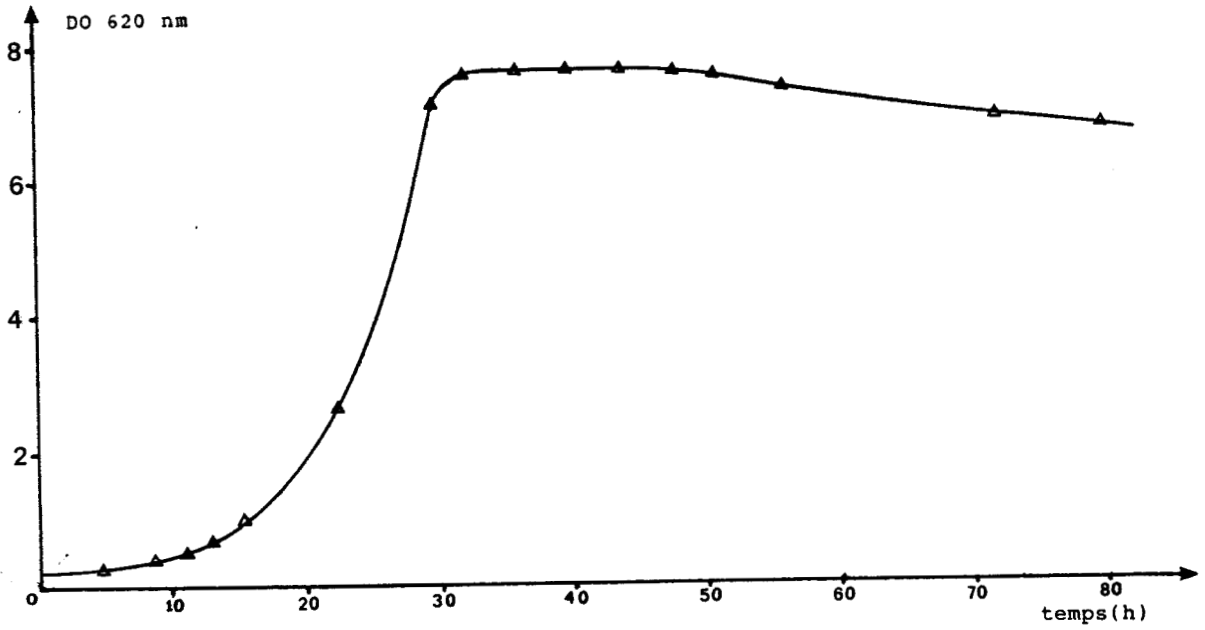
1-CINETIQUE DE LA FERMENTATION :

Le suivi de la cinétique (Figure 8 p.89) met en évidence pour la production dans un milieu contenant 37 g/l de BCC et 10 g/l de glucose les éléments suivants pour la production de biomasse :

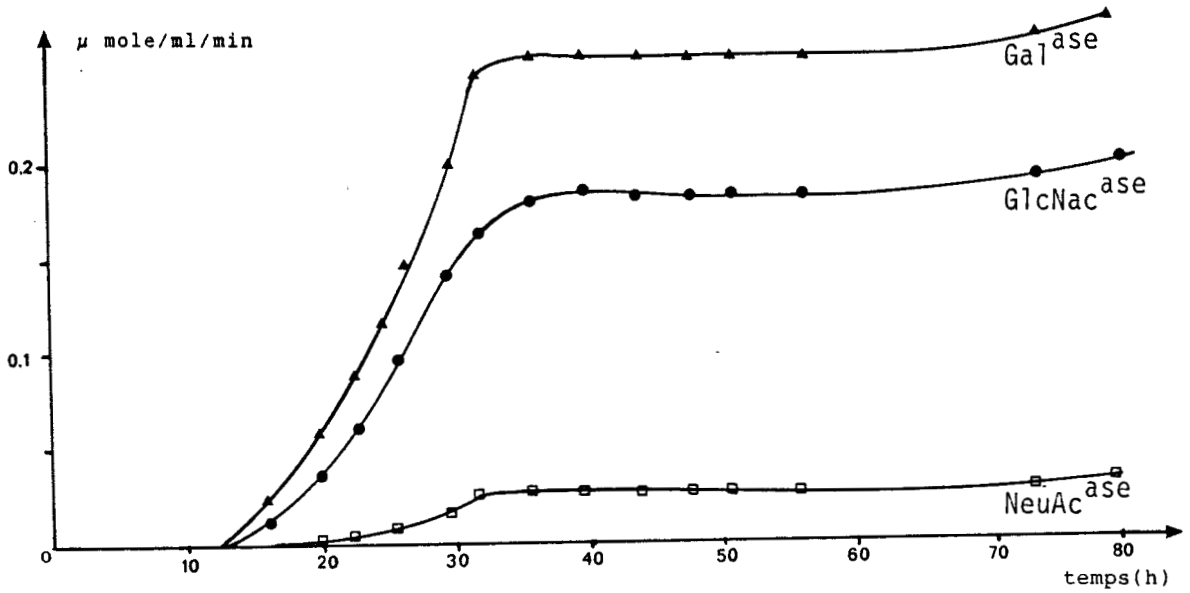
- une phase de latence de 9 heures,
- une phase exponentielle de 21 heures,
- une phase de plateau de 20 heures.

Ensuite, à partir de 48 heures, on constate une diminution de la biomasse.

Pour la production d'enzymes, la sécrétion dans le milieu de culture et la quantité d'enzymes récupérée suivent la cinétique précédemment décrite jusqu'à la fin de la phase plateau où l'on arrive à



Production de biomasse



Production de glycosidases dans le milieu de culture

Figure 8 : Cinétique de fermentation de B. bifidum.

obtenir par litre de culture 2,4 g de matière sèche cellulaire qui contiennent :

- 3.150 U de Gal^{***},
- 390 U de GlcNAc^{***},
- 64 U de NeuAc^{***},
- 85 U de Fuc^{***}.

Au cours de la phase décroissante nous constatons une augmentation des activités enzymatiques excrétées dans le milieu de culture de façon plus importante pour la Gal^{***} et la GlcNAc^{***}. Au bout de 70 heures, nous retrouvons dans le milieu de culture (après récupération des cellules par centrifugation) et par litre de culture :

- 15 U de Gal^{***},
- 24 U de GlcNAc^{***},
- 3,5 U de NeuAc^{***}.

A ce moment de la cinétique les activités cellulaires ont suivi l'évolution de la biomasse mais la perte (20 p.100) par rapport à la fin de la phase plateau est plus importante que celle des cellules (13 p.100).

En conséquence, et comme nous n'avons pas noter de différence soit au niveau de l'extraction, soit au niveau de la purification, pour des cellules récoltées lors de la phase exponentielle ou au cours de la phase plateau, nous centrifugerons le milieu de culture après 35 heures de fermentation.

2-INFLUENCE DES CONDITIONS DE CULTURE EN FERMENTEUR SUR LA PRODUCTION DE GLYCOSIDASES :

Nous avons fait varier le pourcentage de glucose, de BCC et introduit dans le milieu du gynolactose, du lait de Femme et du lait de Vache. Les fermentations ont été conduites à pH 6,8 et à 37 °C, sous atmosphère N₂/CO₂ et durant 35 heures.

a-Influence du glucose :

La croissance de *B. bifidum* en fermenteur augmente en fonction de la concentration en glucose. De 0,6 g de matière sèche cellulaire dans un milieu dépourvu de glucose on passe à 3,15 g dans un milieu en contenant 30 g/l (Tableau XXV p.91).

**TABLEAU XXV : INFLUENCE DES CONDITIONS DE CULTURE EN FERMENTEUR
SUR LA PRODUCTION DE GLYCOSIDASE PAR *B bifidum*
AA/22**

Milieu Utilisé	BCC g/l	37	37	37	37	37
	Glucose g/l	0	10	10	20	30
	pH final	7,0	*	6,8	6,8	6,7
Poids de cellule sèche g par litre de culture		0,60	0,55	2,45	2,75	3,15
Gal ^{***}	U/g de cellules sèches	656	20	1280	1585	1710
	U/l de culture	394	10	3150	4340	5340
GlcNac ^{***}	U/g de cellules sèches	136	35	160	180	160
	U/l de culture	82	19	392	495	500
NeuAc ^{***}	U/g de cellules sèches	21,5	5,0	26,0	28,0	27,0
	U/l de culture	7	3	64	77	85
Fuc ^{***}	U/g de cellules sèches	27	11	25	24	30
	U/l de culture	16	6	86	66	94

* Pas d'agitation et pas de régulation de pH.

- L'incertitude sur la mesure de la biomasse est de 2 %
- L'incertitude sur la mesure des activités enzymatiques en u/l de culture est de 5 %
- L'incertitude sur la mesure des activités enzymatiques en u/g de cellule sèche est de 10 %.

La concentration en glucose a un effet sur la concentration cellulaire en Gal^{***}. En effet, nous passons de 656 à 1.710 U/g de cellule sèche quand la concentration en glucose passe de 0 à 30 g/l.

Par contre le glucose a peu d'effets sur la concentration en GlcNAc^{***}, NeuAc^{***} et Fuc^{***} au niveau des cellules. On n'observe en particulier aucun effet réel d'une augmentation de la concentration en glucose sur la concentration de ces glycosidases. On remarque aussi que dans des conditions de culture défavorables (pH non régulé) non seulement la quantité de cellules diminue mais aussi et surtout la concentration en glycosidases.

b-Influence des facteurs bifidigènes :

Les résultats sont reportés dans le tableau XXVI page 93. En ce qui concerne la biomasse, les poids de cellules que nous obtenons en fin de fermentation sont comparables à ceux que nous obtenions en flacons de pénicilline pour un même milieu de culture. Et comme nous l'avions déjà remarqué l'addition de lait de Femme à un milieu moins concentré en milieu nutritif (5 g/l de BCC) augmente très fortement la croissance cellulaire : l'addition de 6,6 p. 100 de lait multiplie ici la biomasse par 3. Par contre, dans le cas où *B. bifidum* est cultivé dans un milieu plus concentré en éléments nutritifs, l'influence des facteurs bifidigènes : lait de Femme 6,6 p. 100, gynolactose 1 g/l, ne se fait pas sentir.

Pour ce qui est de la production d'enzymes, la culture en fermenteur augmente de manière importante la concentration des cellules en glycosidases. En effet, dans un milieu contenant 37 g/l de BCC et 10 g/l de glucose et par rapport aux résultats obtenus en flacon de pénicilline on obtient : 20 fois plus de Gal^{***}, 2 fois plus de GlcNAc^{***} et 120 fois plus de Neu^{***}. Ces résultats peuvent s'expliquer par les conditions plus défavorables que nous avons utilisées pour la culture en flacon de pénicilline, notamment, au niveau de la durée de culture

Comme nous l'avions déjà observé l'addition de lait Humain (6,6 p. 100) dans un milieu faiblement concentré en BCC augmente très fortement les concentrations en glycosidases et de manière plus importante que pour un milieu riche en éléments nutritifs. En effet, pour une concentration de 5 g/l de BCC les concentrations en Gal^{***} et GlcNAc^{***} sont multipliées par 3, en Fuc^{***} par 2, celle de la Neu^{***} n'augmente pas. Malgré cela les résultats obtenus par litre de culture nous amène à ne pas utiliser un milieu pauvre en éléments nutritifs car si nous comparons un milieu à 5

**TABEAU XXVI : INFLUENCE DES FACTEURS BIFIDIGENES SUR LA PRODUCTION EN
FERMENTEUR DE GLYCOSIDASES PAR *B. bifidum* AA/22**

Milieu Utilisé	BCC g/l	37	37	37	37	37	37	5	5
	Glucose g/l	10	10 +3,5% LV	10 3,5 % LF	10 6,6 % LV	10 6,6 % LF	10 1g de Gyno	0	0 3,5 % LF
	pH final	6,9	7,2	6,8	7,0	7,0	6,8	6,5	6,8
Poids de cellule sèche g par litre de culture		2,45	2,40	2,65	2,55	2,85	2,40	0,30	1,50
Galase	U/g de cellules sèches	1280	1260	1120	1200	1600	1920	36	120
	U/l de culture	3150	3025	2960	3060	4560	4610	11	180
GlcNacase	U/g de cellules sèches	160	150	120	130	200	320	34	93
	U/l de culture	392	360	320	330	570	768	11,2	140
NeuAcase	U/g de cellules sèches	26	21,5	18,5	19	30,5	33,0	3,5	34,0
	U/l de culture	64	50	53	49	87	102	1	50
Fucase	U/g de cellules sèches	25	28	26	22	28	30	6,5	13
	U/l de culture	86	67	67	56	80	72	2	20

LF = Lait de femme.

LV = Lait de vache.

- L'incertitude sur la mesure de la biomasse est de 2 %
- L'incertitude sur la mesure des activités enzymatiques en u/l de culture est de 5 %
- L'incertitude sur la mesure des activités enzymatiques en u/g de cellule sèche est de 10 %.

g/l de BCC supplémenté par 6,6 p.100 de lait de Femme et un milieu à 37 g/l de BCC et 10 g/l de glucose non supplémenté en facteurs bifidigènes nous obtenons dans le second cas 18 fois plus de Gal^{***}, 3 fois plus de GlcNAc^{***}, 4 fois plus de Fuc^{***} et la même quantité de Neu^{***}.

Dans un milieu composé de 37 g/l de BCC et de 10 g/l de glucose par litre de culture, l'influence de l'addition de lait humain sur la concentration en enzymes n'apparaît que pour une valeur de 6,6 p.100. Alors que l'addition de 6,6 p.100 de lait de Vache n'a aucun effet, résultats qui confirment ceux obtenus en flacons de pénicilline. L'augmentation de ces concentrations est encore plus forte pour 1 g/l de gynolactose. On augmente respectivement les concentrations en Gal^{***} de 1,5, en GlcNAc^{***}, NeuAc^{***} et Fuc^{***} de 2.

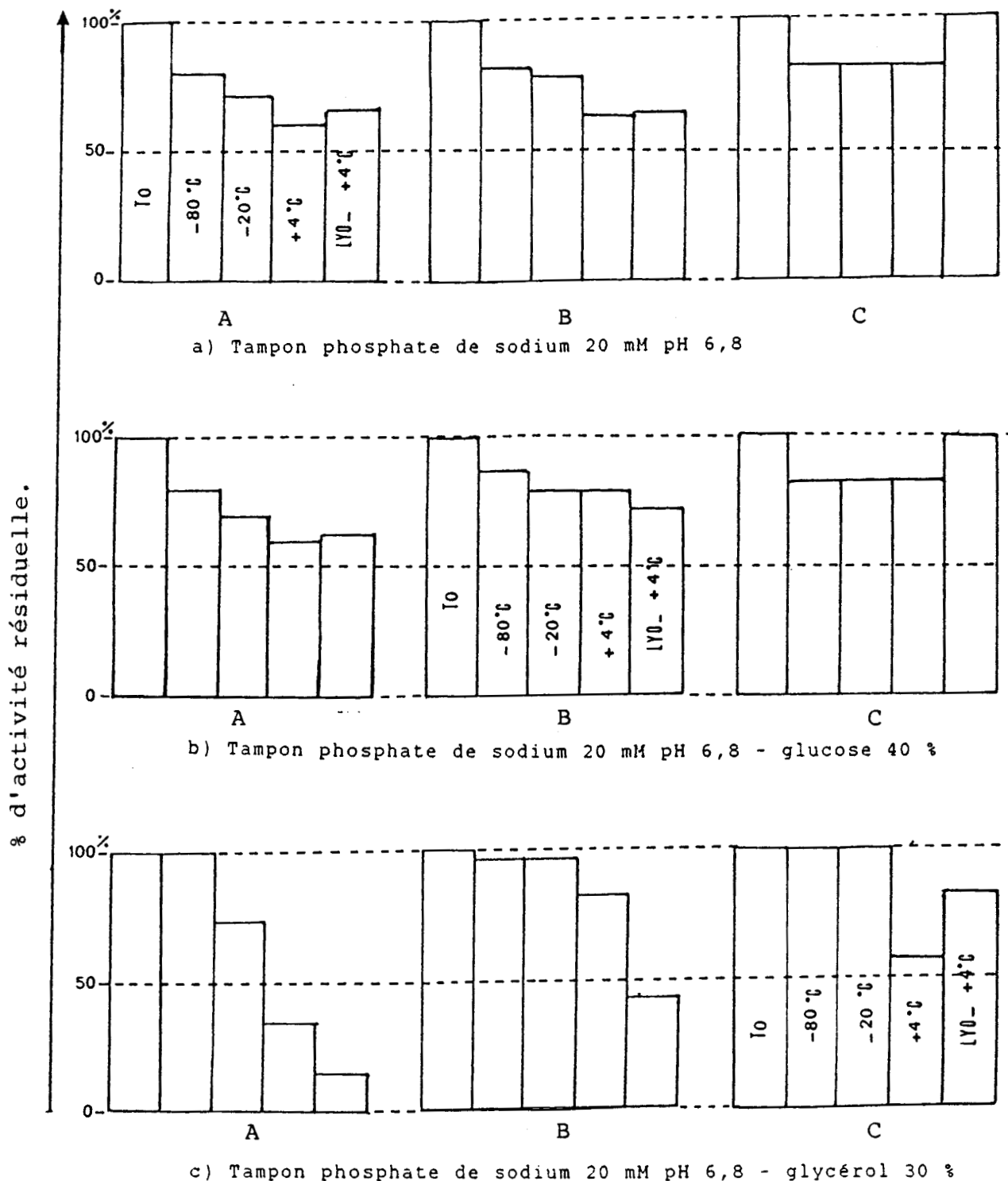
c-Conclusions

La culture en fermenteur de *B. bifidum* montre l'importance des facteurs glucidiques du lait de Femme sur le développement de ce microorganisme.

Cependant, nous n'avons pu mettre en évidence d'action importante de ces composés sur la cinétique de croissance des bactéries. Par contre, la réactivité ou le potentiel glycosidasique de la cellule sont augmentés. Malheureusement, les quantités de cellules nécessaires à l'étude de l'extraction et à la mise au point de la purification des glycosidases de *B. bifidum* AA/22 nous oblige à utiliser des volumes de culture important (200 l). La supplémentation de ce type de fermenteur en lait de Femme ou en sucres du lait humain purifiés s'avère techniquement difficile. C'est pourquoi nous avons utilisé comme matériel de départ dans la suite de notre travail des cellules de *Bifidobacterium bifidum* issues d'une fermentation sur un milieu contenant 37 g/l de BCC et 10 g/l de glucose. Dans ces conditions, nous obtenons 2,5 g de matière sèche cellulaire par litre de milieu de culture et sans avoir optimiser les conditions d'extraction aux ultra-sons, 4200 U de β -D-gal^{***}, 1280 U de N-acétyl- β -D-glcNAc^{***}, 200 U de α -D-neuAc^{***} et 420 U de α -L-fuc^{***}.

F-CONSERVATION DES CELLULES :

Les résultats obtenus (Figure 9 p.95) montrent l'importance de la température pour la récupération des activités enzymatiques. Pour les



A: activité Gal^{ase}
 B: activité GlcNac^{ase}
 C: activité NeuAc^{ase}

Les mesures ont été faites après un stockage des cellules de 6 mois et après traitement aux ultra-sons.

FIGURE 9 : INFLUENCE DES CONDITIONS DE CONSERVATION DES CELLULES DE B. bifidum A-A/2-2 SUR LES ACTIVITES GLYCOSIDASIQUES

trois activités enzymatiques étudiées après 6 mois de conservation, les meilleurs résultats quelque soit le milieu de conservation sont obtenus pour une température de -80 °C. Dans ces conditions le milieu le plus adapté se révèle être un tampon phosphate de sodium 20 mM pH 6,8 additionné de 30 p.100 de glycérol, on retrouve alors 100 p. 100 de la β -D-gal^{***} de la α -D-neuAc^{***} et 95 p. 100 de la β -D-glcNAc^{***}.

En ce qui concerne la lyophilisation on remarque que : quelque soit le milieu de conservation envisagé la Gal^{***} et GlcNAc^{***} ne supportent pas bien ce traitement. Par contre la NeuAc^{***} est stable durant ce traitement et son activité est conservée jusqu'à 6 mois de stockage sous forme lyophilisée à +4 °C. On remarque d'autre part que l'addition de glycérol dans le milieu avant lyophilisation provoque une désactivation plus importante des différentes enzymes lors de cette étape.

III-EXTRACTION DES ACTIVITES ENZYMATIQUES

A-ETUDE DES DIFFERENTS MOYENS D'EXTRACTION :

1-RESULTATS

La purification des activités enzymatiques nécessite l'obtention d'enzymes "solubles" pour pouvoir utiliser les procédés chromatographiques classiques. Les résultats présentés dans le tableau XXVII p. 97 sont donc donnés après séparation des cellules par centrifugation à 100.000 g et filtration sur filtre de porosité 0,45 μ m. Nous observons que les traitements chimiques ou enzymatiques (autolyse, traitement des cellules au butanol ou mélange lysozyme pronase) ne nous permettent pas de récupérer une quantité suffisante d'activités glycosidasiques. L'utilisation de la congélation/décongélation successives ne nous donne pas non plus de meilleurs résultats, cette technique étant inefficace sur les bactéries gram + dont la résistance de la paroi est plus grande. Par contre, des résultats sont plus intéressants avec des techniques permettant de faire éclater la structure cellulaire et la paroi. Ainsi le traitement par la presse de FRENCH permet d'obtenir : 1.350 U de Gal^{***}, 250 U de GlcNAc^{***}, 90 U de Fuc^{***}, 2,6 U de NeuAc^{***} par gramme de

TABLEAU XXVII : ACTIVITE EXOGLYCOSIDASIQUE EXTRAITE A PARTIR DE B.bifidum AA/22 SELON DIFFERENTS TRAITEMENTS (u/g de cellule sèche)

	Galase		GlcNacase		NeuAcase		Fucase	
	U/g	S/C+S	U/g	S/C+S	U/g	S/C+S	U/g	S/C+S
Presse de French (1)	1 350	44 %	250	20 %	66	2 %	90	18 %
Ultra-sons (1)	1 700	75 %	510	63 %	80	40 %	170	50 %
Butanol (2)	43		2,5		0,8			
Lysozyme Pronase (2)	360		35		4,8			
Autolyse 48 h (2)	315		28		0,1			

$$\% \text{ S/C+S} = \frac{\text{Activité totale dans le surnageant à } 100\,000 \text{ g}}{\text{Activité totale du culot} + \text{Activité du surnageant à } 100\,000 \text{ g}}$$

(1): Les activités sont mesurées sur la suspension cellulaire.

(2): Les activités sont mesurées sur le surnageant de centrifugation des cellules.

matière sèche cellulaire. Cette technique donne donc accès aux enzymes intra-cellulaires sans désorganiser les structures membranaires. Les ultra-sons permettent d'obtenir un éclatement des cellules mais également de désorganiser tous les types de membranes. Cette technique donne accès aux enzymes intra-cellulaires "solubles" mais aussi à une partie des enzymes membranaires.

Pour comparer les deux types d'extraction nous avons utilisé des suspensions enzymatiques issues du traitement de 10 g de matière sèche cellulaire repris dans 50 ml de tampon phosphate de sodium 20 mM pH 6,8. Après récupération de la partie soluble et filtration, nous pouvons voir que l'extraction aux ultra-sons présente un avantage certain puisqu'elle permet de récupérer par rapport à l'extraction à la presse de FRENCH : 2 fois plus de Gal^{***}, 3 fois plus de GlcNAc^{***}, 20 fois plus de NeuAc^{***}, 1,5 fois plus de Fuc^{***}.

A la suite des extractions à la presse de FRENCH et aux ultra-sons nous avons effectué sur les fractions obtenues des centrifugations différentielles et nous avons mesuré à chaque étape les activités enzymatiques contenues dans le surnageant et le culot, les résultats sont rassemblés dans le tableau XXVIII page 99.

L'extraction à la presse de FRENCH nous permet de ne pas modifier la répartition des activités entre les fractions cellulaires, libres et conjugués et d'autre part l'on peut considérer qu'après une centrifugation à 20.000 g durant une heure les parois et les membranes cellulaires sont sédimentées. La mesure des activités glycosidasiques dans le culot de centrifugation par rapport à l'activité totale permet de déterminer que 71 p.100 de l'activité Gal^{***}, 86 p.100 de l'activité GlcNAc^{***}, 99 p.100 de l'activité NeuAc^{***} et 88 p.100 de l'activité Fuc^{***} sont d'origine membranaire lors de l'extraction à la presse de FRENCH. D'autre part nous constatons par ailleurs que l'extraction aux ultra-sons solubilise beaucoup plus les activités enzymatiques puisque à toutes les vitesses de centrifugation nous obtenons des pourcentages de récupération des activités nettement plus importants et ce pour les quatre activités glycosidasiques étudiées. A titre de comparaison, dans la fraction insoluble après centrifugation à 20.000 g nous obtenons 20 p.100 pour la Gal^{***}, 30 p.100 pour la GlcNAc^{***}, 54 p.100 pour la NeuAc^{***}, 47 p.100 pour la Fuc^{***}.



TABLEAU XXVIII: REPARTITION DES ACTIVITES GLYCOSIDASIQUES SELON LA VITESSE DE CENTRIFUGATION APRES :

a) Extraction à la presse de French

Vitesse des centrifugations en g	Galase		GlcNacase		NeuAcase		Fucase	
	AS	% AT	AS	% AT	AS	% AT	AS	% AT
3 000	4,1	40	0,7	20	0,005	2	0,05	
20 000	5,2	29	1,0	14	0,01	1	0,12	
50 000	3,2	25	0,5	10	0,006	0,2	0,11	
100 000	2,9	22	0,4	9	0,005	0,05	0,10	
200 000	2,9	20	0,35	8	0,005	0,05	0,10	

b) Extraction aux ultra-sons

Vitesse des centrifugations en g	Galase		GlcNacase		NeuAcase		Fucase	
	AS	% AT	AS	% AT	AS	% AT	AS	% AT
3 000	6,6	85	1,5	72	0,53	50	0,2	57
20 000	8,5	80	2,0	70	0,7	46	0,4	53
50 000	8,0	77	1,9	68	0,4	43	0,39	52
100 000	7,9	75	1,8	63	0,1	40	0,38	50
200 000	6,8	50	1,5	45	0,1	10	0,35	30

AS = Activité en Unité/mg de protéine.

% AT =
$$\frac{\text{Activité du surnageant de centrifugation}}{\text{Activité sur la solution enzymatique après extraction}}$$

Nous observons que le traitement aux ultra-sons est sélectif des activités glycosidasiques puisque nous augmentons les activités spécifiques des suspensions récupérées, nous extrayons ainsi, des membranes de la bactérie, plus d'activité enzymatique que de protéines contaminantes par rapport à ce que contient le cytoplasme. L'utilisation des ultra-sons n'a pas une efficacité identique pour toutes les enzymes : en effet, si nous comparons les activités contenues dans un surnageant 100.000 g de suspensions enzymatiques obtenues par ultra-sons d'une part et par presse de French d'autre part, le second contient 20 fois moins de Neu Ac^{***}, 4,5 fois moins de GlcNac^{***}, 4 fois moins de Fuc^{***} et 2,5 fois moins de Gal^{***}. Ceci semble indiquer que les activités glycosidasiques de *B. bifidum* ne sont pas toutes ancrées de la même façon dans les éléments membranaires de la cellule bactérienne, ou que leurs concentrations dans les parties membranaires sont différentes de celles du cytoplasme.

Enfin, dans les deux types d'extraction les activités spécifiques de nos quatre enzymes évoluent de la même façon suivant la vitesse de centrifugation. Jusqu'à 20.000 g nous enrichissons le surnageant en glycosidases, l'activité spécifique des enzymes augmentant pour des vitesses de centrifugation supérieures, nous entraînons dans le culot autant et parfois plus de protéines enzymatiques que de glycosidases, les activités spécifiques ont alors tendance à diminuer.

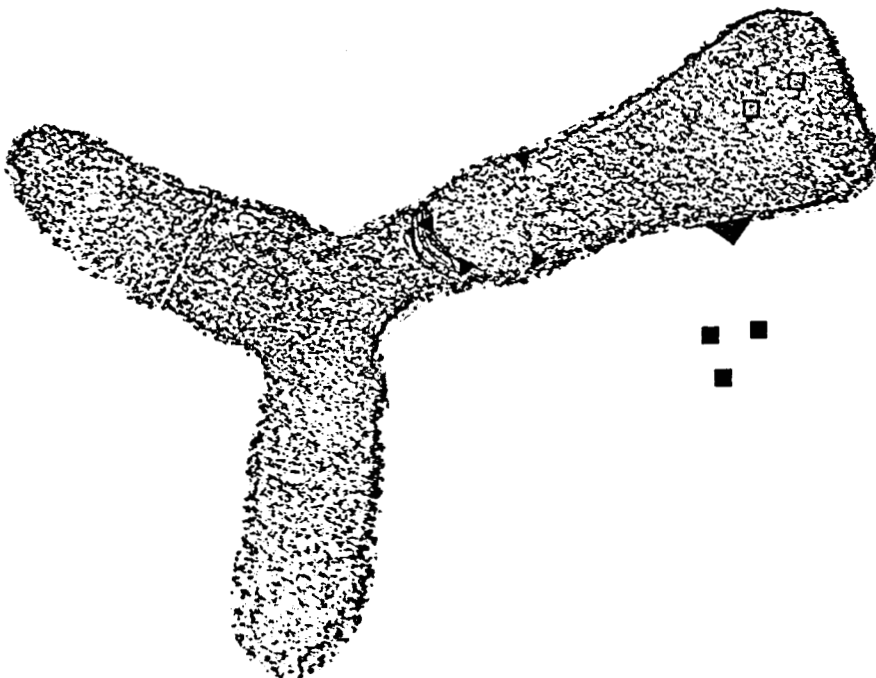
2-CONCLUSION :

L'utilisation des ultra-sons est une technique qui semble bien adaptée pour l'extraction des activités enzymatiques. Elle nous permet d'obtenir une fraction enzymatique chromatographiable après centrifugation à 100.000 g et qui contiendra 75 p.100 de la Gal^{***}, 63 p.100 de la GlcNac^{***}, 40 p.100 de la NeuAc^{***} et 50 p.100 de la Fuc^{***}

Cette étude nous a aussi permis, en fonction des conditions de culture, d'envisager une répartition des enzymes dans la cellule de *B. bifidum*. Les résultats sont rassemblés dans le tableau XXIX page 101. On constate que peu d'enzymes sont excrétées : celle que l'on retrouve le plus dans le milieu de culture (10 p. 100) est la neuraminidase. Le reste de l'activité neuraminidasique mesurée après traitement aux ultra-sons

TABLEAU XXIX : REPARTITION DES ACTIVITES ENZYMATIQUES DANS LA CELLULE DE B. bifidum AA/22

	Gal ^{ase}	GlcNac ^{ase}	NeuAc ^{ase}	Fuc ^{ase}
Enzymes exocellulaires ■	4 %	4 %	10 %	3 %
Enzymes cellulaires externes ►	34 %	53 %	89 %	13 %
Enzymes cytoplasmiques (surnageant Presse de French) □	21 %	6 %	1 %	11 %
Enzymes membranaires (Culot Presse de French - enzymes cellulaires externes) ►	18 %	1 %	0	27 %
Enzymes membranaires extractibles aux ultra-sons = (surnageant ultra-sons - enzymes cytoplasmiques)	23 %	36 %	0	30 %



correspond à celle obtenue sur les cellules entières, ce qui semble montrer soit que toute l'activité est dirigée vers l'extérieur de la bactérie, soit que lors du traitement aux ultra-sons autant d'activité ont été extraite que détruite, ce qui semble peu probable puisque l'extraction à la presse de French moins dénaturante n'a pas mis en évidence d'autres activités.

B-OPTIMISATION DE L'EXTRACTION AUX ULTRA-SONS DES ACTIVITES ENZYMATIQUES :

L'ensemble des extractions qui ont été réalisées dans ce chapitre ont été faites, sauf indications contraires dans le texte, en tampon phosphate de sodium 20 mM pH 6,8 et pour une concentration en matière sèche cellulaire de 2 g/l, les débris cellulaires sont ensuite écartés au moyen d'une centrifugation à 100 000 g durant une heure.

Une étude préalable a permis d'étudier l'influence de divers tampons sur les activités enzymatiques et de préciser en particulier que le tampon phosphate n'influe pas sur les activités glycosidasiques étudiées.

1-MILIEU D'EXTRACTION :

a-Effets des détergents sur les activités enzymatiques :

Nous avons étudié l'influence de certains additifs sur une fraction enzymatique extraite aux ultra-sons et centrifugée à 100.000 g pendant une heure. Comme l'indiquent les résultats présentés dans le tableau XXX p.103, les détergents non ioniques et zwiterioniques ont un effet activateur sur les activités enzymatiques. Dans les conditions utilisées, le Triton X 100 et le NP 40 se révèlent être les meilleurs activateurs. Par contre l'addition d'EDTA 2mM ou de DTT 2 mM ne modifie pas les activités glycosidasiques étudiées. On peut également noter que les activités sont inhibées en présence de SDS 0,1 p.100 et d'urée.

Les glycosidases de *B. bifidum* étant en partie membranaire, il est normal que des éléments modifiant les tensions superficielles, comme les détergents, modifient les activités enzymatiques. A partir de maintenant, nous tiendrons compte dans l'expression de nos résultats des effets activateurs de ceux-ci.

**TABLEAUXXX : EFFET DES DETERGENTS SUR LES ACTIVITES
GLYCOSIDASIQVES DE B. bifidum AA/22**

Pourcentage d'activité résiduelle exprimé par rapport à celui obtenu en tampon phosphate de sodium 20 mM - pH 6,8.

	Gal ^{***}	GlcNac ^{***}	NeuAc ^{***}
<u>Non ionique</u>			
Octyl glucoside 0,1 %	150	120	140
Nonidet P 40 0,1 %	180	160	140
Triton X 100 0,1 %	160	110	150
Tween 20 0,1 %	140	105	100
<u>Anionique</u>			
Acide desoxycholique 0,1 %	100	90	85
N-Lauryl-sarcosine 0,1 %	90	100	90
SDS 0,1 %	0	30	25
<u>Cationique</u>			
Cetavlon	0	50	40
<u>Zwitterionique</u>			
Z 3-12	150	140	150
Z 3-16	130	100	120
Chaps	110	120	105

b-Extraction en présence d'additifs :

Dans le tableau XXXI p.105 nous comparons les activités obtenues après extraction aux ultra-sons en présence d'additifs qui pourraient soit favoriser la solubilisation des membranes (détergents), soit préserver les activités enzymatiques après leur passage sous forme soluble (détergents, EDTA, réducteurs).

L'extraction dans un tampon phosphate de sodium n'a que peu d'effet par rapport à celle effectuée dans l'eau, de même que la modification de la force ionique par l'addition de NaCl, la présence d'un réducteur ou celle de sels biliaires.

L'addition d'octyl glucoside (0,1 p.100), de NP 40 (0,1 p.100), de Triton X 100 (0,1 p.100) et de N lauryl sarcosine (0,1 p.100) permet de doubler la quantité d'enzymes récupérées. Cependant, pour des raisons d'interférences du Triton et du N-lauryl-sarcosine avec le dosage des protéines, il n'a pas toujours été possible de déterminer les activités spécifiques des enzymes extraites.

D'autre part le faible gain apporté par l'emploi de l'octyl glucoside comparé au coût de ce détergent pour des extractions répétées nous a fait choisir le Nonidet P 40 comme agent additif lors des extractions aux ultra-sons. En combinant l'effet de l'EDTA et du NP 40 dans du tampon phosphate de sodium 20 mM pH 6,8, nous obtenons par rapport à une extraction réalisée en tampon seul : 2 fois plus de Gal^{***}, 3 fois plus de GlcNAc^{***}, de NeuAc^{***} et de Fuc^{***}, 1,5 fois plus de protéines. On remarquera toutefois que les effets ne sont pas cumulatifs.

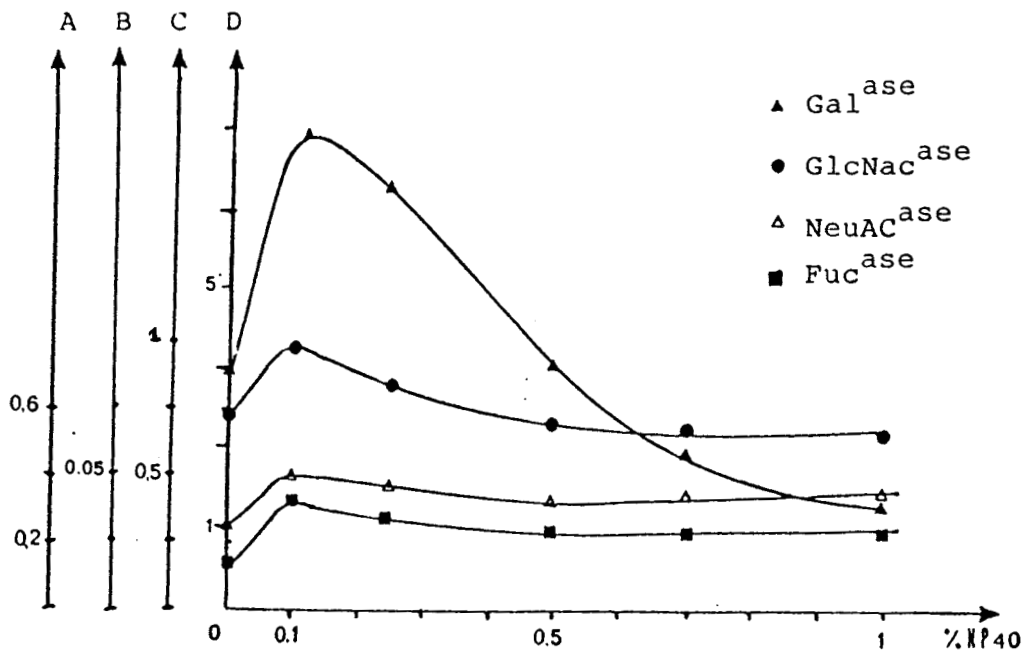
c-Concentration optimale en Nonidet P 40 :

Les valeurs des activités spécifiques des glycosidases (Figure 10 p.106) font apparaître un optimum à 0,1 p.100 de NP 40 pour la récupération des enzymes après centrifugation. Ces résultats tiennent compte des variations d'activités que nous avons mesurées pour différentes concentrations en NP 40. Pour des concentrations supérieures (jusqu'à 0,5 p.100) nous retrouvons de moins en moins d'enzymes actives sous forme soluble, et au delà de 0,5 p.100 le phénomène se stabilise. Pour ces valeurs, nous avons pu voir une augmentation de la quantité d'enzymes dans le culot de centrifugation. De plus, nous constatons que la quantité de protéines augmente elle aussi jusqu'à 0,3 p.100 de détergent et se stabilise ensuite pour des concentrations allant jusqu'à 1 p.100.

TABLEAU XXXI: INFLUENCE DE LA COMPOSITION DU TAMPON SUR L'EXTRACTION DES ACTIVITES GLYCOSIDASIQUES AUX ULTRA-SONS (U/mg DE PROTEINE)

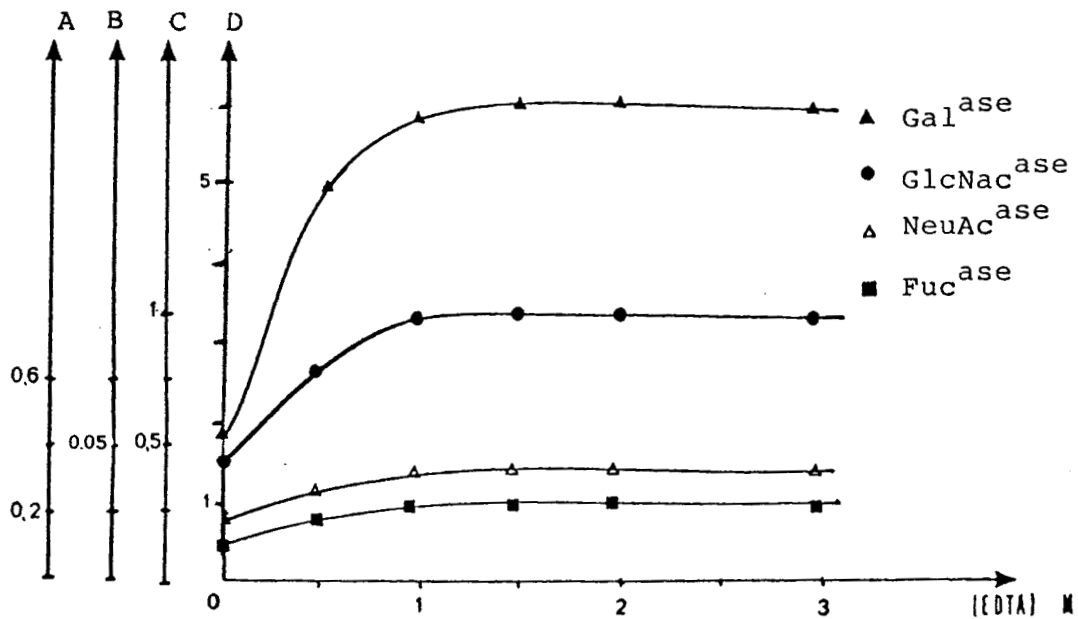
Milieu d'extraction	Galase	GlcNacase	NeuAcase
H ₂ O	3,5	0,45	0,05
Tampon PO ₄ ³⁻ 20 mM pH 6,8	4,8	0,7	0,06
+ NaCl 50 mM	4,6	0,7	0,05
+ EDTA 1 mM	6,4	1,2	0,08
+ DTT 1 mM	3,5	0,4	0,05
+ octyl glucoside 0,1 %	7,0	1,6	0,1
+ NP 40 0,1 %	7,1	1,4	0,1
+ Triton X 100 0,1 %	7,0	1,9	0,1
+ acide desoxycholique 0,1 %	4	0,7	0,02
+ N-lauryl-sarcosine 0,1 %	4,4	1,4	0,02
Tampon PO ₄ ³⁻ 20 mM pH 6,8 NP 40 0,1 % EDTA 1 mM	7,0	1,6	0,09

Les extractions ont été réalisées avec une concentration en matière sèche cellulaire de 3,8% et durant 5 min.



A, B, C, D : représentent les memes paramètres que dans la figure 11.

FIGURE 10 : INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN NP40 SUR L'EXTRACTION DES ACTIVITES GLYCOSIDASQUES:.



A: activité Fuc^{ase} U par mg de protéine.

B: activité NeuAc^{ase} U par mg de protéine.

C: activité GlcNac^{ase} U par mg de protéine.

D: activité Gal^{ase} U par mg de protéine.

FIGURE 11 : INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN EDTA SUR L'EXTRACTION DES ACTIVITES GLYCOSIDASQUES .

A la concentration optimale de 0,1 p.100 le gain d'activité par rapport à un milieu sans détergent est beaucoup plus important pour la Gal^{***}, la NeuAc^{***} et la Fuc^{***} dont les activités spécifiques ont été doublées, que pour la GlcNAc^{***} dont l'activité spécifique a été multipliée par 1,4.

d-Concentration optimale en EDTA :

Les résultats reportés sur la figure 11 p.106 font apparaître un effet positif de l'EDTA sur l'extraction des activités glycosidasiques. Cette augmentation s'observe pour des concentrations en EDTA allant jusqu'à 1 mM. Au delà de cette concentration l'EDTA n'influence plus la quantité d'exoglycosidases obtenues. L'EDTA peut intervenir, soit au niveau de la stabilisation des enzymes (protection contre les phénomènes d'oxydation catalysée par les métaux), soit comme agent perturbateur des structures membranaires.

e-Analyse par gel filtration des fractions extraites aux ultra-sons :

Il est nécessaire de connaître l'effet engendré par l'addition de NP 40 et d'EDTA sur la masse moléculaire des protéines extraites. Il est indispensable en particulier, de vérifier que le détergent n'a pas provoqué la formation de micelles contenant des activités enzymatiques (bien que nous nous trouvons à une concentration inférieure à la concentration micellaire critique du NP 40). C'est pourquoi nous avons comparé le profil et la répartition des pics obtenus après gel filtration sur une fraction traitée aux ultra-sons en tampon phosphate de sodium 20 mM pH 6,8 avec une seconde fraction dans le même tampon mais contenant 0,1 p.100 de NP 40 et 1 mM d' EDTA (Figure 12 p.108). L'examen des profils d'élution montre l'apparition en présence de NP 40 d'un pic supplémentaire de haute masse moléculaire sans activité enzymatique.

De plus il n'y a pas eu de modification de la masse moléculaire des différentes enzymes; nous les retrouvons sous forme de deux pics : une fraction s'éluant au volume mort de la colonne et ayant une masse moléculaire supérieure à $2 \cdot 10^6$ (Pic 1), l'autre fraction correspondant à des masses moléculaires comprises entre 30.000 et 80.000 (Pic 2). Cependant au niveau de la réactivité de ces pics il apparaît des

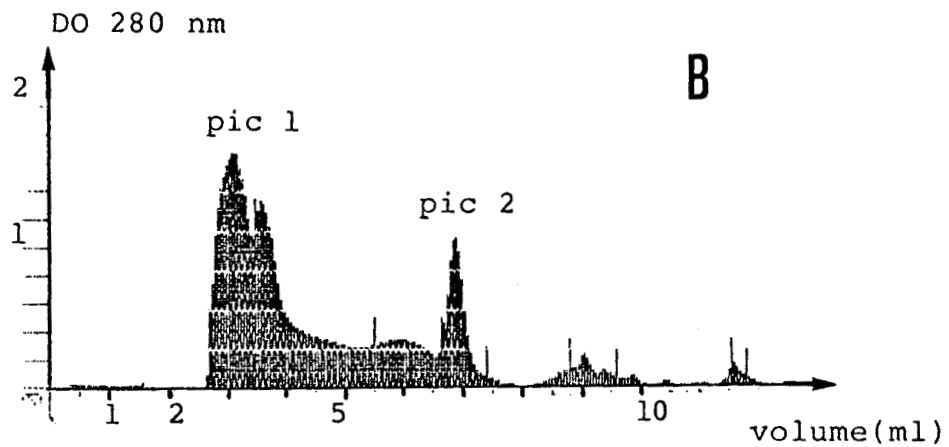
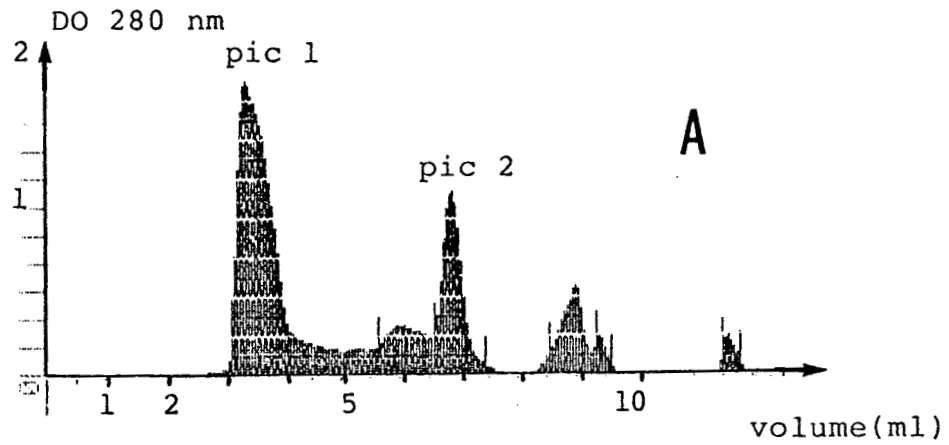


Figure 12: Profils de chromatographie sur superose 6 des protéines solubles après extraction aux ultrasons: Effet du NP₄₀.

A - Extraction en tampon phosphate de sodium 20 mM pH 6,8.

B - Extraction en tampon phosphate de sodium 20 mM pH 6,8
NP₄₀ 0,1 %.

différences (Tableau XXXII p.110) : dans le cas d'une extraction en présence de détergents, il y a une augmentation des activités au niveau du Pic 2 alors que la réactivité au niveau du Pic 1 (de haut poids moléculaire) diminue. C'est en particulier le cas pour la NeuAc^{***} pour laquelle on a 1,7 fois plus d'activité au niveau du pic de faible poids moléculaire.

2-INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN MATIERE SECHE :

Nous avons fait varier la concentration en cellules de 5 à 75 grammes de matière sèche par litre. Les résultats reportés dans le tableau XXXIII page 111 montrent que l'efficacité maximale d'extraction par les ultra-sons est obtenue pour une concentration de 30 grammes de cellules sèches par litre de tampon d'extraction.

3-INFLUENCE DU TEMPS DE SONNAGE SUR L'EXTRACTION DES ACTIVITES GLYCOSIDASIQUES

a-Cinétique d'extraction :

Les différentes activités enzymatiques ne sont pas "solubilisées" de façon identique, lors du traitement aux ultra-sons (Fig.13 p.112)

Les activités Gal^{***} et GlcNAc^{***} sont obtenues après un temps de sonnage voisin de 5 minutes. Ceci nous permet d'extraire 2.250 U de Gal^{***} et 510 U de GlcNAc^{***} par gramme de cellules sèches. De part et d'autre de cet optimum les quantités d'enzymes extraites diminuent. Après 3 minutes et 7 minutes de traitement nous obtenons 80 p. 100 de ce maximum pour les deux activités. Mais alors qu'en début de traitement aux ultra-sons nous retrouvons cette activité localisée au niveau du culot de centrifugation : pour 7 minutes de traitement nous constatons par contre une dénaturation des activités Gal^{***} et GlcNAc^{***}.

La cinétique d'extraction est différente pour la NeuAc^{***} : un traitement de 3 minutes permet d'obtenir 65 U par gramme de cellules sèches. Aucune modification de réactivité n'est obtenue même s'il est supérieur à 10 minutes. L'utilisation d'un temps de traitement aux ultra-sons supérieurs à 10 minutes permettrait d'obtenir des solutions

TABLEAU XXXII: ANALYSE PAR GEL FILTRATION SUR SUPEROSE 6 DE SOLUTIONS ENZYMATIQUES OBTENUES PAR EXTRACTION AVEC ET SANS DETERGENTS

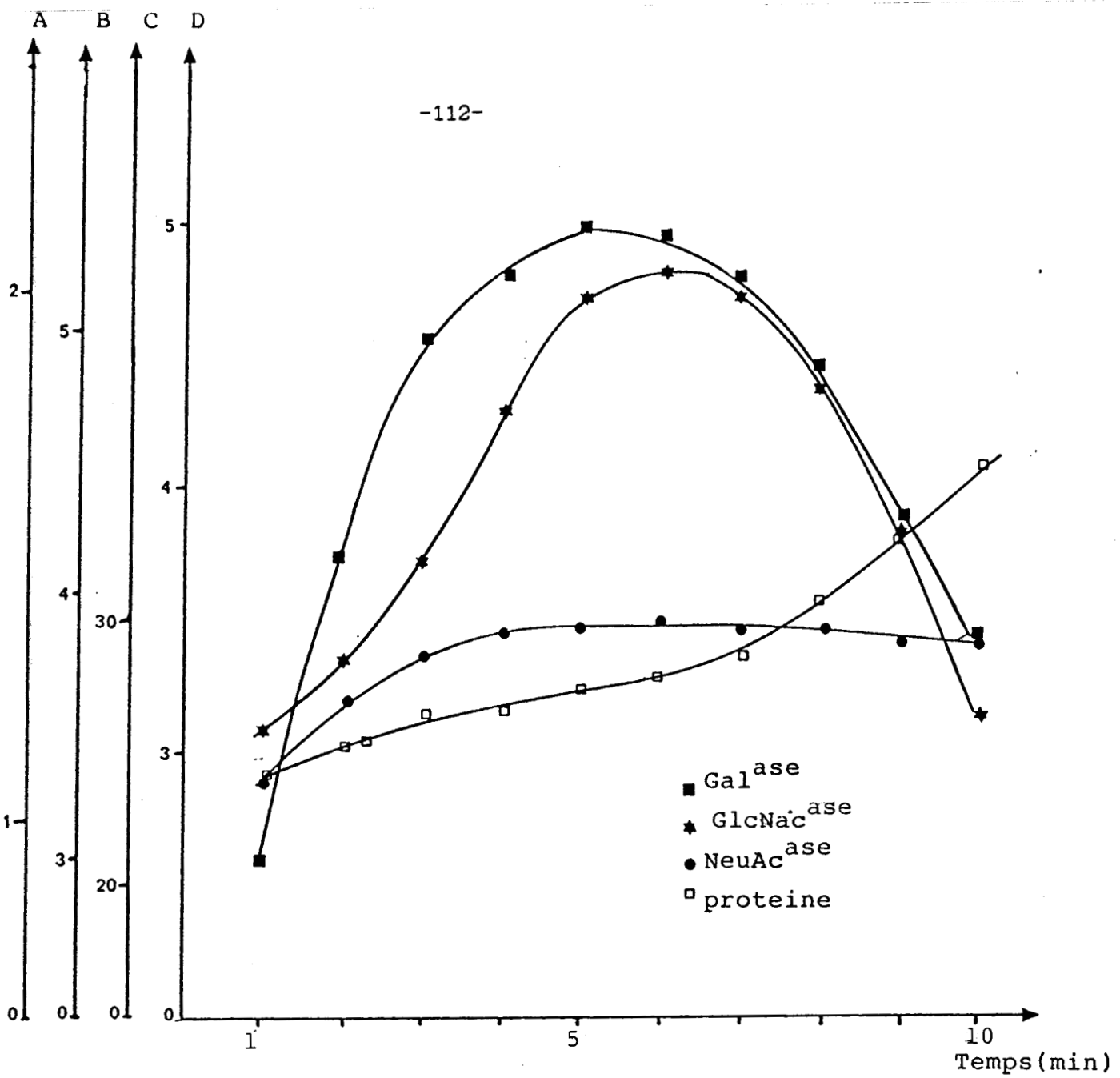
		Tampon PO ₄ de Na		+ NP40 0,1 %	
		Activité totale	% de l'activité totale	Activité totale	% de l'activité totale
Solution injectée (100 µl)	Galase	5 U		8,4 U	
	GlcNacase	1,2 U		2 U	
	NeuAcase	0,01 U		0,1 U	
	Fucase	0,15 U		0,4 U	
	Protéines	0,8 mg		1,2 mg	
Pic 1	Galase	0,5 U	10 %	0,42 U	5 %
	GlcNacase	0,18 U	15 %	0,14 U	7 %
	NeuAcase	0,005 U	50 %	0,020 U	20 %
	Fucase	0,045 U	30 %	0,14 U	12 %
	Protéines	0,41 mg		0,52 mg	
Pic 2	Galase	4,25 U	85 %	7,70 U	92 %
	GlcNacase	1,0 U	83 %	1,80 U	90 %
	NeuAcase	0,004 U	47 %	0,075 U	75 %
	Fucase	0,100 U	65 %	1,02 U	85 %
	Protéines	0,14 mg		0,20 mg	

TABLEAU XXXIII: INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN CELLULE SUR L' EXTRACTION DE GLYCOSIDASE AUX ULTRA-SONS.

% Matière sèche	Activité enzymatique	% Activité dans surnageant de sonnage	% Activité récupérée
0,47	Gal*** GlcNac*** NeuAc***	62 45 20	40 12 6,8
0,95	Gal*** GlcNac*** NeuAc***	79 48 43	41 10 16
1,90	Gal*** GlcNac*** NeuAc***	83 64 48	46 17 23
3,80	Gal*** GlcNac*** NeuAc***	100 100 100	53 27 46
7,60	Gal*** GlcNac*** NeuAc***	70 73 47	42 19 18
15,20	Gal*** GlcNac*** NeuAc***	49 45 12	28 12 3

$$\% \text{ Activité récupérée} = 100 \times \frac{\text{Activité surnageant}}{\text{Activité culot centrifugation}}$$

$$\% \text{ Matière sèche} : \frac{\text{masse cellule sèche (g)}}{100 \text{ ml de tampon d'extraction}}$$



A: activité Gal^{ase} 10³ U par g de matière sèche
B: activité GlcNac^{ase} 10² U par g de matière sèche
C: activité NeuAc^{ase} U par g de matière sèche
D: proteine 10² mg par g de matière sèche

L'extraction a été réalisée pour une concentration de 3,8% de matière sèche dans un tampon phosphate de sodium 20mM pH 6,8 EDTA 1mM NP₄₀ 0,1%.

FIGURE: 13 CINETIQUE D'EXTRACTION DES ACTIVITES ENZYMATIQUES PAR ULTRA-SONS

enzymatiques contenant plus d'activités NeuAc*** par rapport aux autres activités glycosidasiques sans pour cela en augmenter l'activité spécifique.

La quantité de protéines "solubilisées" augmente régulièrement durant le traitement. Nous obtenons ainsi à 5 minutes 320 mg de protéines par g de cellules sèches et 400 mg à 10 minutes.

b-Analyse des fractions enzymatiques obtenues :

L'évolution des masses moléculaires déterminées par gel filtration sur Superose 6, en fonction du temps de traitement aux ultra-sons, pour une quantité de cellule constante, montre (Figure 14 p.114) que jusqu'à 5 minutes de traitement nous obtenons le même profil d'élution, seule l'intensité des pics augmente, et le rapport des pics reste sensiblement constant : 30 p.100 pour le Pic I et 32 p.100 pour le Pic II (Tableau XXXIV p.115). De plus les activités se retrouvent dans tous les cas au niveau des Pics I et II définis précédemment page 107.

Par contre, pour des temps supérieurs à 10 minutes, nous voyons apparaître un massif protéique de hauts poids moléculaires ne possédant pas d'activités enzymatiques ce qui fait diminuer le pourcentage des Pics I et II respectivement de 11 et 20 p.100. Au niveau de la répartition des activités enzymatiques dans ces deux pics, les quatre activités suivent la même évolution. Nous remarquons que jusqu'à 2 minutes de traitement le Pic II renferme plus d'activités enzymatiques, avec des activités spécifiques plus élevées. A partir de 5 minutes de traitement aux ultra-sons les activités se retrouvent de plus en plus dans le Pic I de haut poids moléculaire. Cette remarque est surtout importante pour la NeuAc*** dont le glissement du Pic II vers le Pic I est très marqué 30 p.100 entre 3 et 10 minutes de traitement aux ultra-sons.

C-CONCLUSION :

La technique que nous préconisons pour l'extraction des activités glycosidasiques de *Bifidobacterium bifidum* AA/2.2 est la suivante :

- Les cellules conservées à -80 °C dans un tampon phosphate de sodium 20 mM pH 6,8 sont reprises après trois lavages dans du tampon phosphate de sodium 20 mM pH 6,8 contenant 0,1 p.100 de NP 40 et 1 mM d'EDTA. La concentration cellulaire est équivalente à 3,7 grammes de cellules sèches

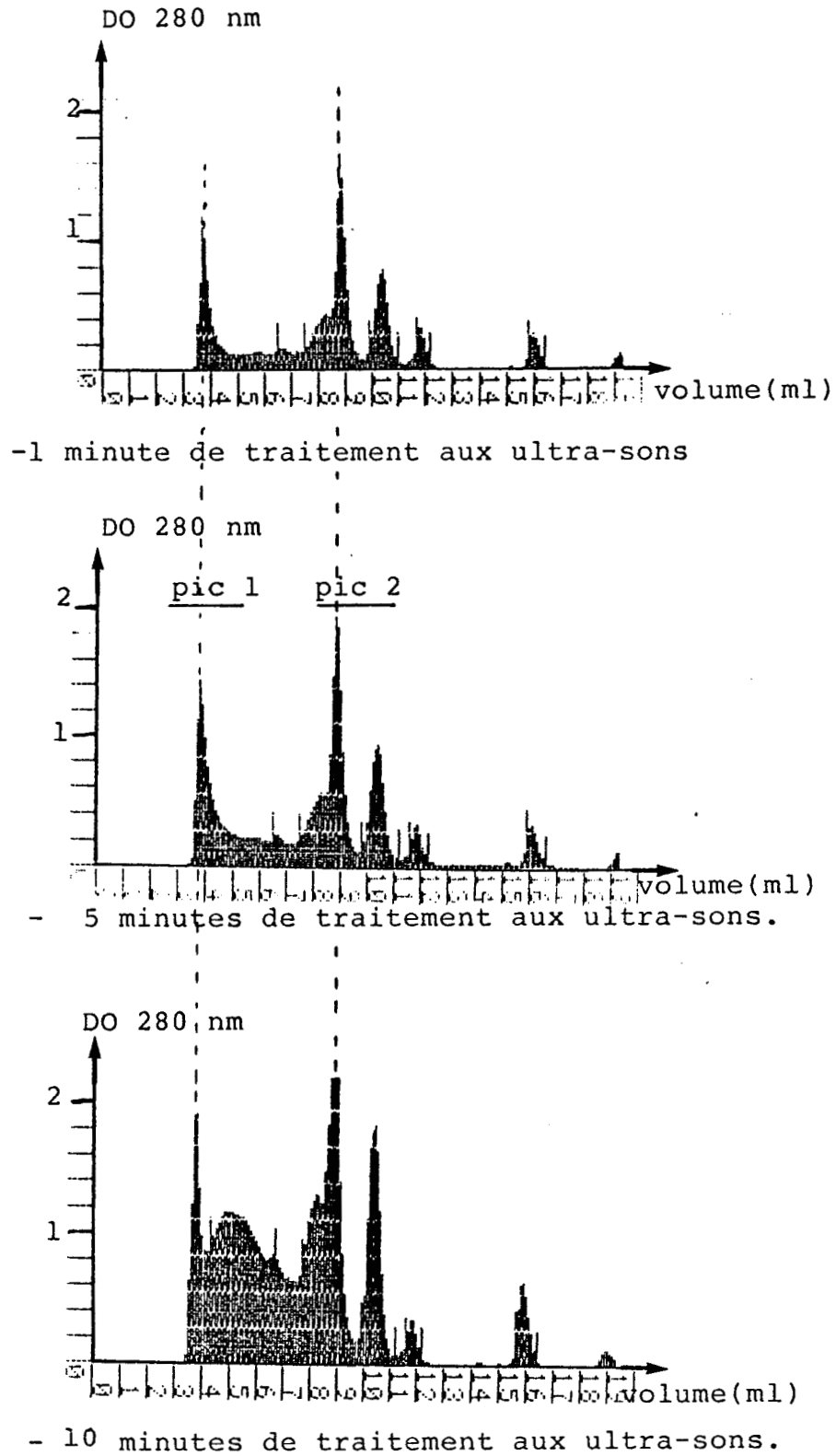


Figure 14: Profils de chromatographie sur superose 6 des proteines solubles après extraction aux ultra-sons: Influence du temps de sonage.

TABLEAUXXXIV : ANALYSE PAR GEL FILTRATION SUR SUPEROSE 6 DE SOLUTIONS EXTRAITES POUR DIFFERENTS TEMPS DE SONNAGE

Temps de sonnage minutes	% protéines		Galase (% U totale)		GlcNacase (% U totale)		NeuAcase (% U totale)		Fucase (% U totale)	
	Pic I	Pic II	Pic I	Pic II	Pic I	Pic II	Pic I	Pic II	Pic I	Pic II
1	26	30	10	85	8	82	15	72	10	80
2	31	32	6	89	6	88	19	80	7	85
5	33	37	5	92	7	90	15	75	12	85
10	11	21	30	63	29	62	40	50	20	70

par litre de tampon.

- L'extraction s'effectue par traitement de 5 minutes aux ultra-sons à une température inférieure à -10 °C.
- Les débris cellulaires sont successivement éliminés par une centrifugation d'une heure à 10.000 g puis à 100.000 g à une température de 4°C.

Les caractéristiques de la suspension enzymatique que nous obtenons sont les suivantes : pour un gramme de matière sèche cellulaire on extrait 321 mg de protéines qui renferment 2.250 U de Gal^{***}, 515 U de GlcNAc^{***}, 30 U de NeuAc^{***} et 120 U de Fuc^{***}. Les techniques de mise en évidence d'activité protéolytique que nous avons utilisées ne nous ont pas permis de mettre en évidence la présence de protéases dans ces solutions extraites aux ultra-sons.

IV-PURIFICATION ET CARACTERISATION DE L'ACTIVITE NEURAMINIDASIQUE

L'étude et la purification d'une neuraminidase sont intéressantes car cette enzyme est utilisée dans l'étude des relations structure - fonction des glycoprotéines.

Depuis que SHILA en 1957 a le premier mis en évidence la présence d'une neuraminidase chez les Bifidobactéries, certains auteurs comme NICOLAI (1981) et LAUER (1972) ont étudié ce type d'enzyme chez *B. lactentis* et *B. bifidum* var *pennsylvanicus*. Nous pouvons rappeler certains résultats que nous avons mis en évidence dans la première partie de notre étude :

- la neuraminidase est, des trois enzymes dont nous avons suivi la production chez *B. bifidum* souche AA/22, la glycosidase qui est la mieux excrétée. 10 p.100 de l'activité totale exprimée chez le microorganisme. Le reste de l'activité neuraminidasique est semble t-il membranaire.
- l'extraction aux ultra-sons nous a permis d'extraire 40 p.100 de cette activité membranaire dont 75 p.100 a une masse moléculaire inférieure à 80.000.

Nous allons étudier l'activité neuraminidasique chez *B. bifidum*, la purification et la caractérisation en constituent la première étape.

A-PURIFICATION DE LA NEURAMINIDASE I DE BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM AA/22 :

Après extraction aux ultra-sons et centrifugation à 100.000 g durant une heure, nous avons purifié cette solution enzymatique par chromatographie liquide sur trois supports successifs :

- un support d'adsorption non spécifique : l'Hydroxylapatite Ultrogel,
- un support d'échanges de cations : la Mono Q HR 5/5,
- un support d'interaction hydrophobe : l'Octyl-Sepharose.

L'analyse de cette purification est exposée dans le tableau XXXV p. 118.

1-CHROMATOGRAPHIE D'ADSORPTION SUR HYDROXYLAPATITE-ULTROGEL :

Nous obtenons 5 pics de protéines dont trois contiennent une activité neuraminidasique. Un premier pic est élué lors de l'équilibration

TABLEAU XXXV: PURIFICATION DE LA NEURAMINIDASE DE *B. BIFIDUM* AA/22

	Volume ml	Protéine mg/ml	Protéine totale	Activité U/ml	Activité spécifi- que	Activité totale	Rendement	Facteur Purificat
Suspension	60	12	720	1,1	0,09	65	100 %	1
HA 30 mM	2000	0,024	48	12,310	0,51	25	39 %	5,7
Mono Q	16	0,1	1,6	1,05	10,5	16,8	27 %	116
OctylSeph	7,5	0,07	0,32	1,53	22	11,5	19 %	244

de la colonne en tampon phosphate de sodium 20 mM pH 6,8 juste après l'injection de la solution enzymatique sur la colonne. On y retrouve 47 p.100 de l'activité neuraminidasique, avec une activité spécifique de 0,29 U/mg de protéine.

Un second pic est élué en tampon phosphate de sodium 30 mM pH 6,8. On y retrouve 42 p.100 de l'activité NeuAc*** avec une activité spécifique de 0,52 U/mg de protéine. Dans cette fraction l'activité NeuAc*** est purifiée 5,7 fois avec un rendement de 39 p.100.

Un troisième pic est élué en tampon phosphate de sodium 150 mM pH 6,8. On y retrouve 10 p.100 de l'activité NeuAc*** avec une activité spécifique de 0,10 U/mg de protéine. Les résultats sont rassemblés dans la figure 15 page 120.

Nous avons poursuivi notre étude sur le second pic qui possède la meilleure activité spécifique et ne contient pas d'autres activités exoglycosidasiques

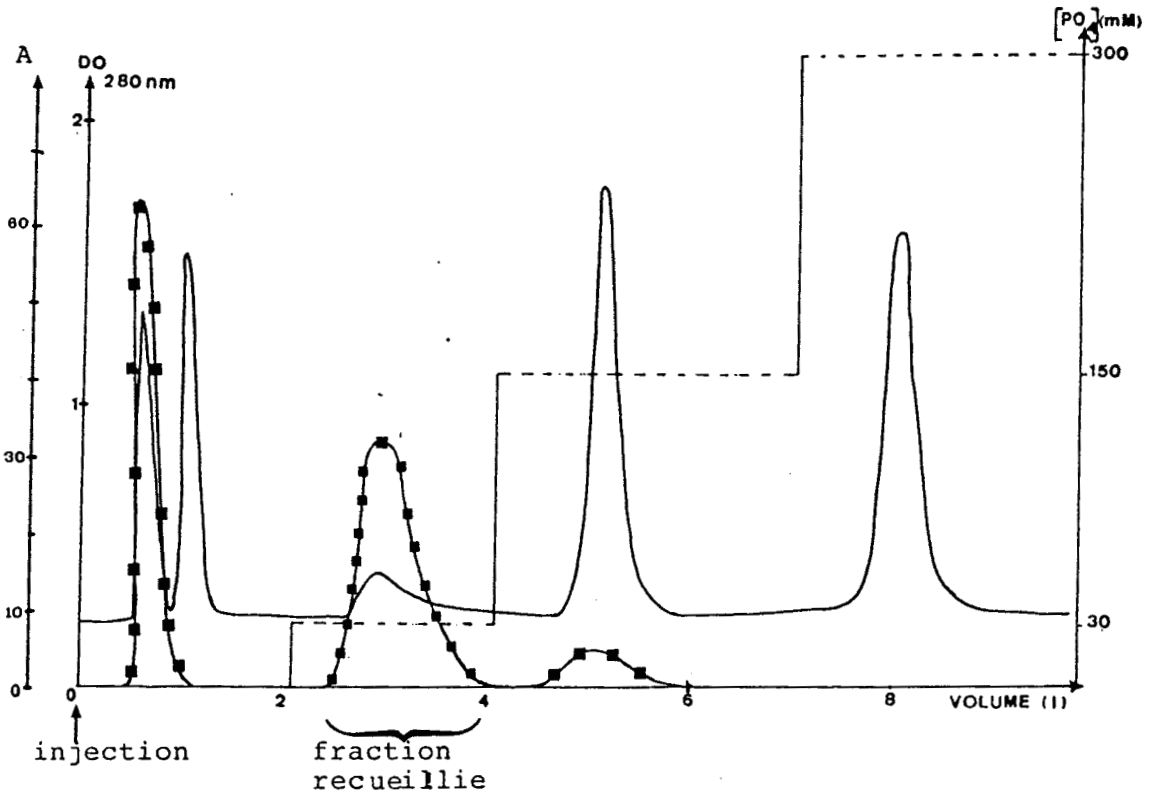
2-CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS SUR MONO Q HR 5/5

L'éluion (Fig. 16 p.121) est réalisée par un gradient linéaire ascendant de NaCl avec une pente de 14 mM/ml en tampon phosphate de sodium 20 mM pH 6,8. On élue ainsi pour une concentration de 175 mM de NaCl une fraction contenant 68 p.100 de l'activité NeuAc*** injectée avec une activité spécifique de 10,5 U/mg. Cette étape nous permet de purifier 20 fois cette activité avec un rendement de 93 p.100.

3-CHROMATOGRAPHIE D'INTERACTION HYDROPHOBE SUR OCTYL SEPHAROSE :

L'éluion (Fig.17 p.122) s'effectue en tampon phosphate de sodium 20 mM pH 6,8 par un gradient de force ionique décroissante en NaCl de 2 M à 0. Pour une concentration en NaCl de 1 M on élue une fraction contenant 68 p.100 de l'activité NeuAc*** injectée, avec une activité spécifique de 22 U/mg, le reste de l'activité est éluée dans un tampon ne contenant pas de NaCl. Le rendement global de cette étape est de 91 p.100.

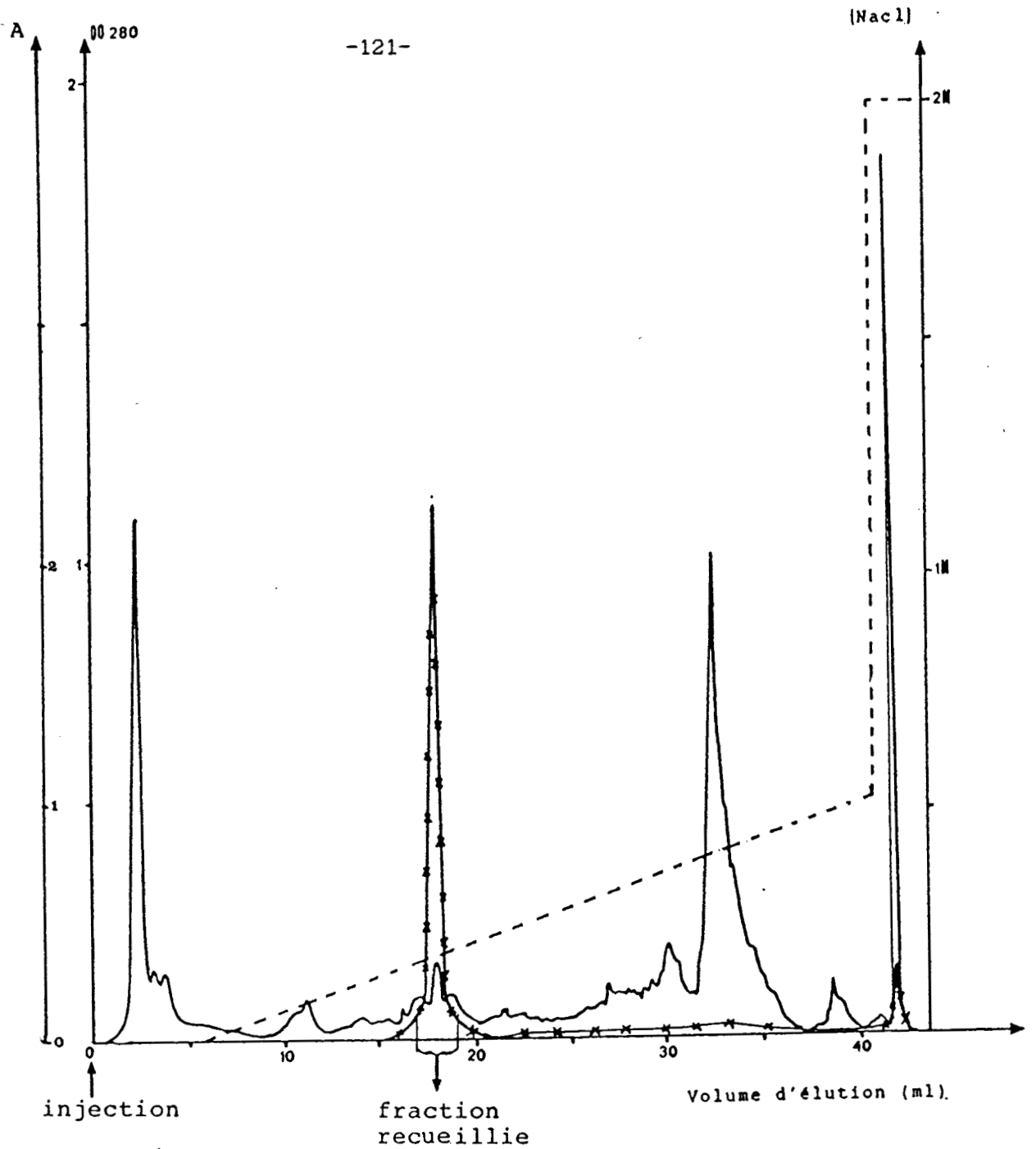
L'analyse par électrophorèse (SDS-PAGE) montre que cette fraction est homogène et contient une protéine ayant une masse moléculaire de 32.000 (figure 18 p.123). Il n'est pas possible de savoir directement si cette protéine correspond bien à l'activité neuraminidasique puisque l'enzyme perd son activité en présence de SDS et β -mercaptoéthanol. Par



----- gradient de force ionique.
——— :profil protéique.
■—■—■ :profil d'activité neuraminidasique.

A:activité neuraminidasique en $\mu\text{mole d'ac. sialique} \cdot \text{min}^{-1}$.

Figure 15: Profil de chromatographie sur Hydroxylapatite.



A: Activité neuraminidasique en $\mu\text{mole ac. sialique} \cdot \text{min}^{-1}$.

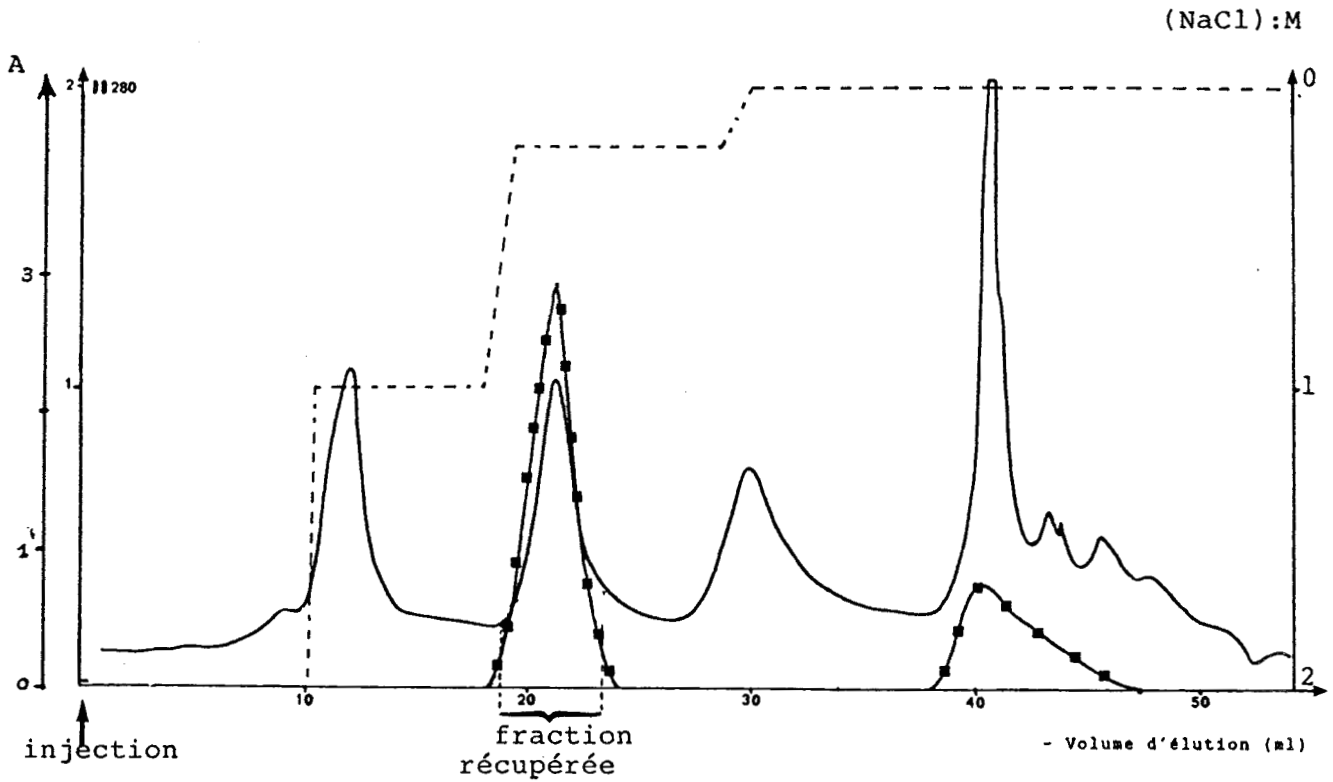
— Profil protéique.

- Profil d'activité neuraminidasique.

--- Gradient de force ionique.

Le volume d'injection correspond à 1/5 de l'activité recueillie sur Hydroxylapatite.

Figure 16: Profil de chromatographie sur Mono Q.



A : activité neuraminidasique en mole ac. sialique.min⁻¹
— : profil protéique.
■ ■ ■ ■ : profil d'activité neuraminidasique.
----- : gradient de force ionique.

Le volume de l'injection correspond à 1/2 de l'activité recueillie sur Mono Q.

Figure.17: Profil de chromatographie sur Octyl-sépharose.

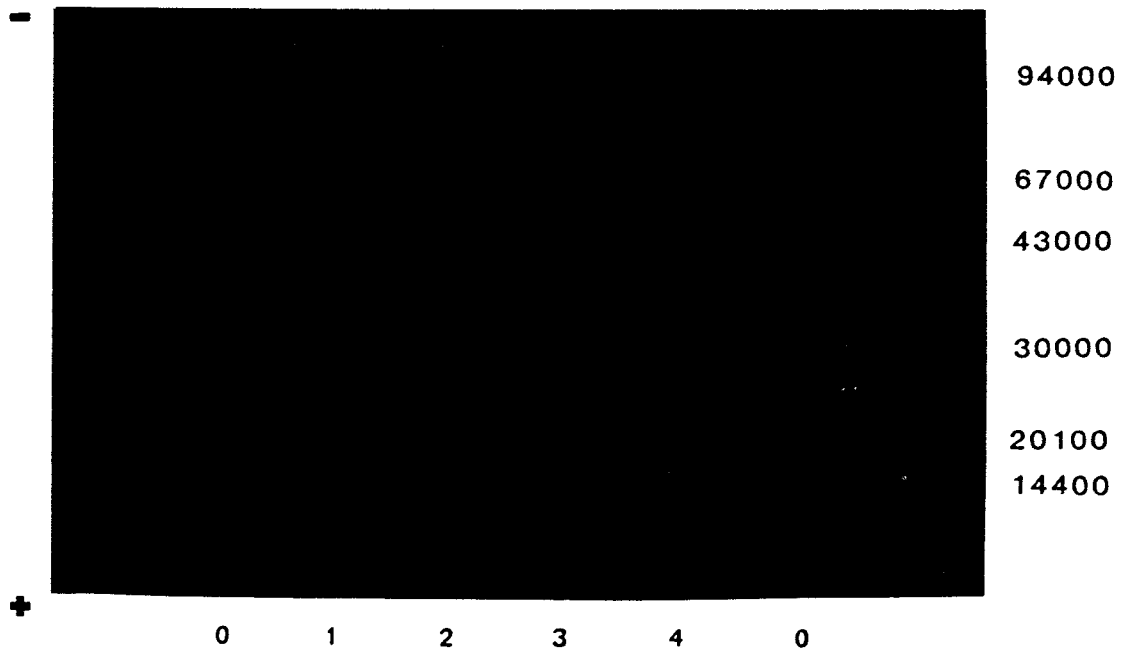
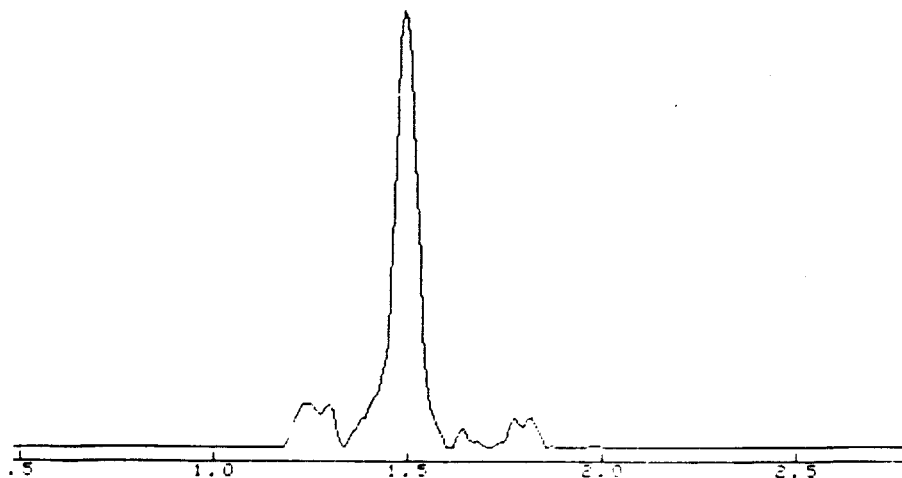


Figure 18: ELECTROPHORESE EN SDS PAGE DES FRACTIONS OBTENUES A PARTIR DE LA FRACTION F_I

- 0) Témoins de masses moléculaires
- 1) Extrait de traitement aux ultra-sons
- 2) Fraction F_I Hydroxylapatite Ultrogel
- 3) Fraction F_I Mono Q
- 4) Fraction F_I Octyl Sépharose



PROFIL AU DENSITOMETRE DE LA FRACTION F_I OCTYL SEPHAROSE (puits 4 de l'électrophorèse ci-dessus)

contre, une électrophorèse native sans SDS et β -mercaptoéthanol montre que la suspension enzymatique est encore homogène puisque nous révélons une bande protéique par coloration au bleu de Coomassie, et le transfert de la protéine sur feuille de nitrocellulose, nous permet de vérifier que cette protéine possède l'activité enzymatique (figure 19 p.125).

4-CONCLUSION :

Le protocole de purification suivi nous a permis de purifier la neuraminidase de *Bifidobacterium bifidum* 244 fois avec un rendement de 18 p.100. La fraction finale obtenue est homogène en électrophorèse native et dénaturante, en gel filtration sur Superose 12 et en chromatofocalisation sur Mono P.

B-CARACTERISTIQUES DE LA NEURAMINIDASE I DE BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM AA/22

:

1-PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES :

a-Masse moléculaire :

Par électrophorèse il existe une relation linéaire entre le logarithme de la masse moléculaire et la mobilité électrophorétique de l'échantillon. L'analyse (Figure 18 p.123) nous donne une masse moléculaire relative de 32.000 ± 2.000 .

Par gel filtration nous avons utilisé deux types de support chromatographique : en présence de NaCl 1 M sur Superose 6 nous obtenons une masse de 75.000 et sur Sépharose CL 6B nous obtenons une masse de 76.000 de la neuraminidase sous forme native. Il semble donc que nous soyons en présence d'une enzyme composée de deux sous unités voisines que l'on n'arrive pas à distinguer par électrophorèse en milieu dénaturant. Les essais d'électrophorèse que nous avons effectués, en modifiant l'agent dénaturant ne nous ont pas permis de visualiser les deux sous unités, de même que les essais en gel filtration en présence d'agents dissociants.

b-Point iso-électrique :

La fraction enzymatique est éluée en un seul pic actif par

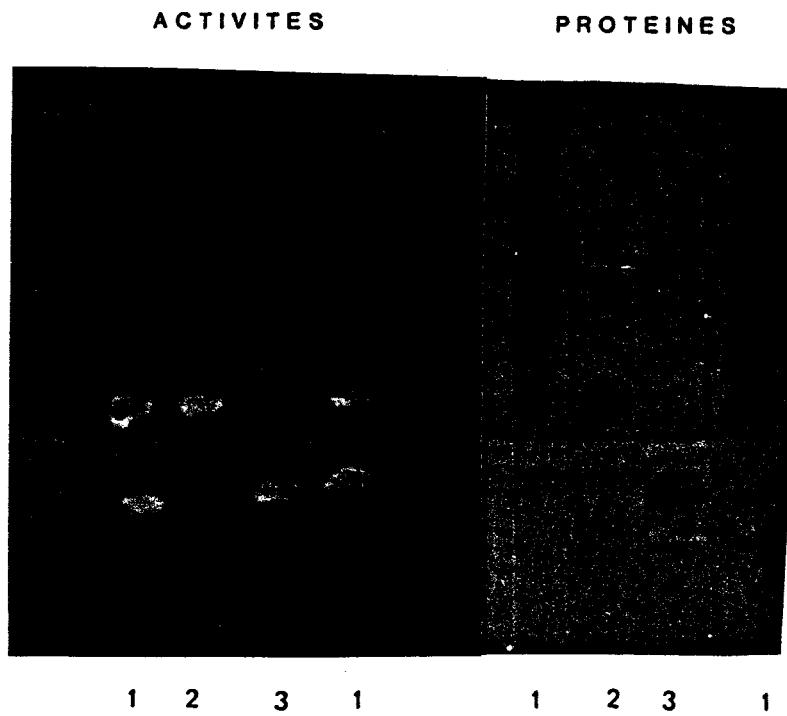
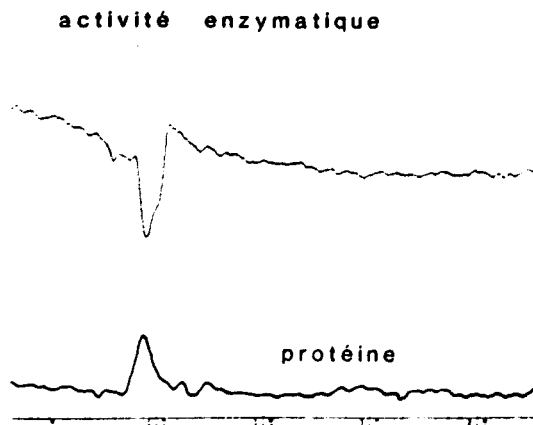


Figure 19: REVELATION DE L'ACTIVITE NEURAMINIDASIQUE APRES ELECTROPHORESE EN CONDITIONS NON DENATURANTE

- 1) Extrait de traitement aux ultra-sons
- 2) Fraction F_{II} Mono Q 0,25 M
- 3) Fraction F_I



SUPERPOSITION DU PROFIL D'ACTIVITE ET DU PROFIL PROTEIQUE DE LA FRACTION F_I AU DENSITOMETRE (puits 3)

chromatofocalisation sur Mono P en FPLC. Ce pic intégré représente 90 p.100 de la surface et correspond à un pHi de 4,2 (figure 20 p.127).

2-PROPRIETES ENZYMATIQUES :

a-Température optimale et stabilité à la température :

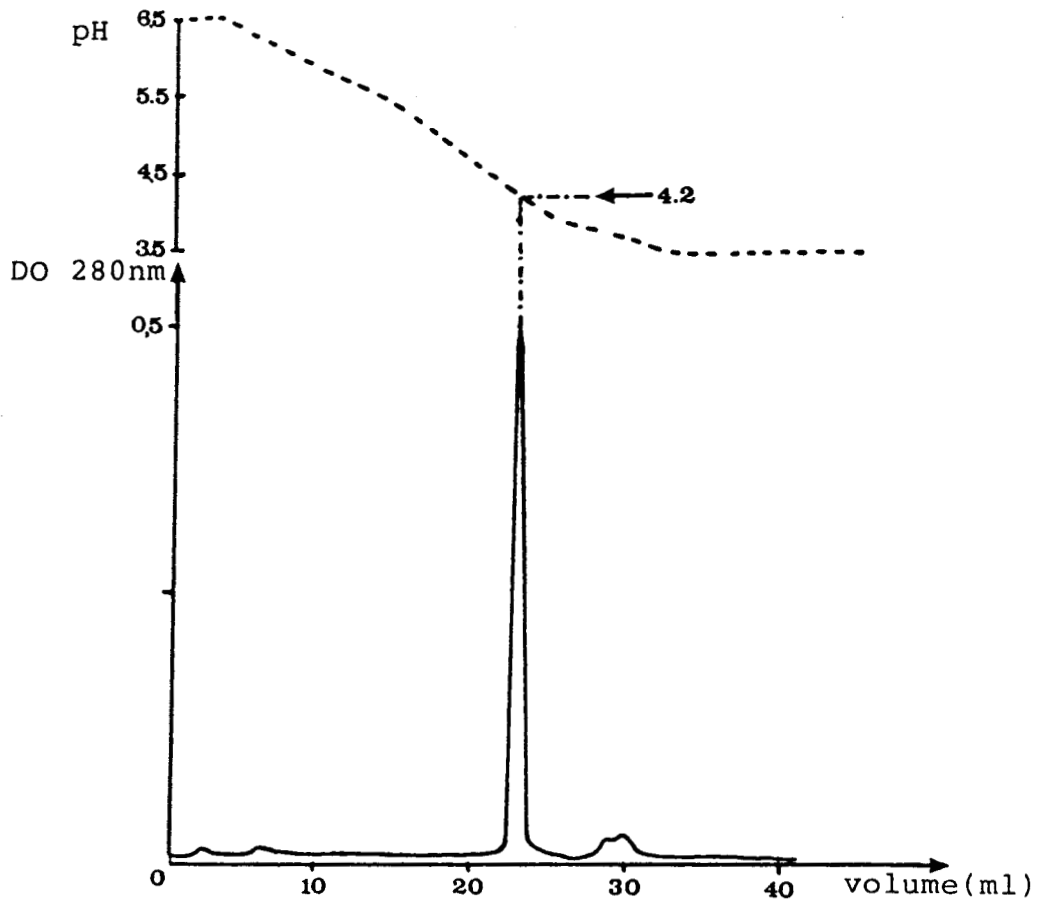
La température optimale d'action de la neuraminidase sur un substrat synthétique (le méthylumbelliféryl acide neuraminique) est de 50 °C (figure 21 p.128). De part et d'autre de cet optimum les variations de l'activité neuraminidasique ne sont pas identiques : à 45°C et 55°C les activités résiduelles sont respectivement de 85 p.100 et 40 p.100 de l'activité initiale.

Les stabilités aux différentes températures ont été étudiées sur des laps de temps de 4 heures (Figure 22 p.129). La neuraminidase est stable pour des températures inférieures à 42 °C; en effet nous obtenons après 4 heures d'incubation à 37 et 42 °C respectivement 95 et 92 p.100 d'activité résiduelle. Pour des températures supérieures l'activité diminue assez rapidement après une heure à 55 °C toute l'activité est détruite et la dénaturation est homogène. Cependant, on peut noter que pour certaines températures, inférieures à 55°C, la dénaturation n'est pas linéaire, ce qui pourrait indiquer que nous sommes en présence d'un système binaire avec deux sous-unités différentes en désaccord avec les résultats obtenus par SDS PAGE ou le système apparaît bien sous forme de 2 sous-unités mais identiques. A moins que la composition en acides aminés soit différente d'une sous unité à l'autre entraînant une variation de stabilité à la température.

L'optimum d'action de la neuraminidase correspond à une température pour laquelle l'enzyme n'est pas stable. Ces deux résultats sont contradictoires. Ils peuvent être expliqués soit par une stabilisation de l'enzyme en présence de substrat que nous n'avons pu mettre en évidence soit plus vraisemblablement par une enzyme à deux sous-unités qui n'aurait pas la même stabilité à la température.

b-pH optimal d'action :

L'activité optimale sur le MU-NeuAc est obtenue pour un pH de 5,0, les variations d'activités de part et d'autre de cet optimum (fig.23 p.130)



- colonne Mono P Pharmacia.
- tampon Bis-Tris pH 7.
- élution par polybuffer 7-4

Figure 20: Chromatofocalisation de la Neuraminidase purifiée.

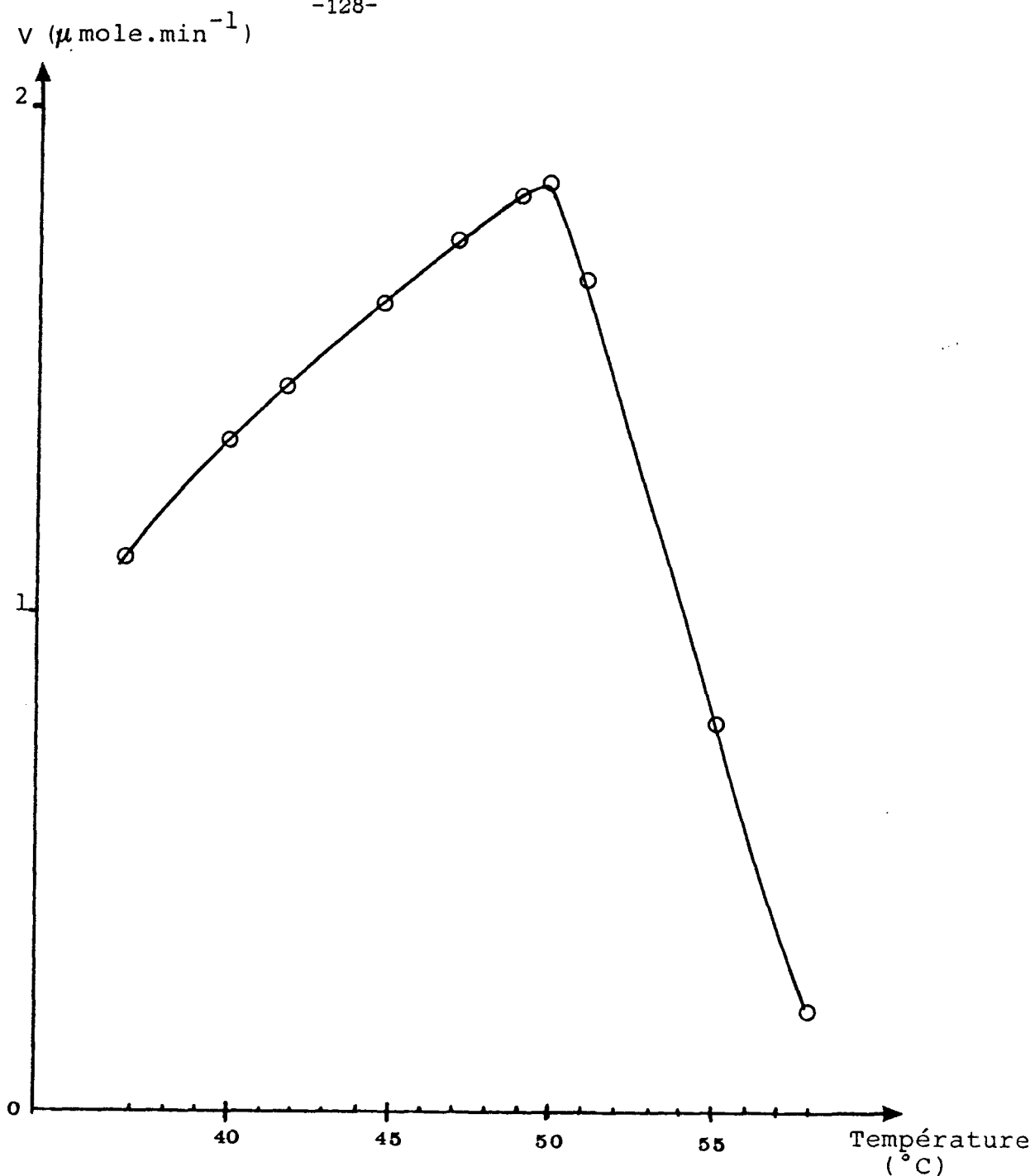


Figure 21: Activité de la Neuraminidase en fonction de la température.
-en tampon phosphate 0,1M-citrate 0,2M pH 5,0.

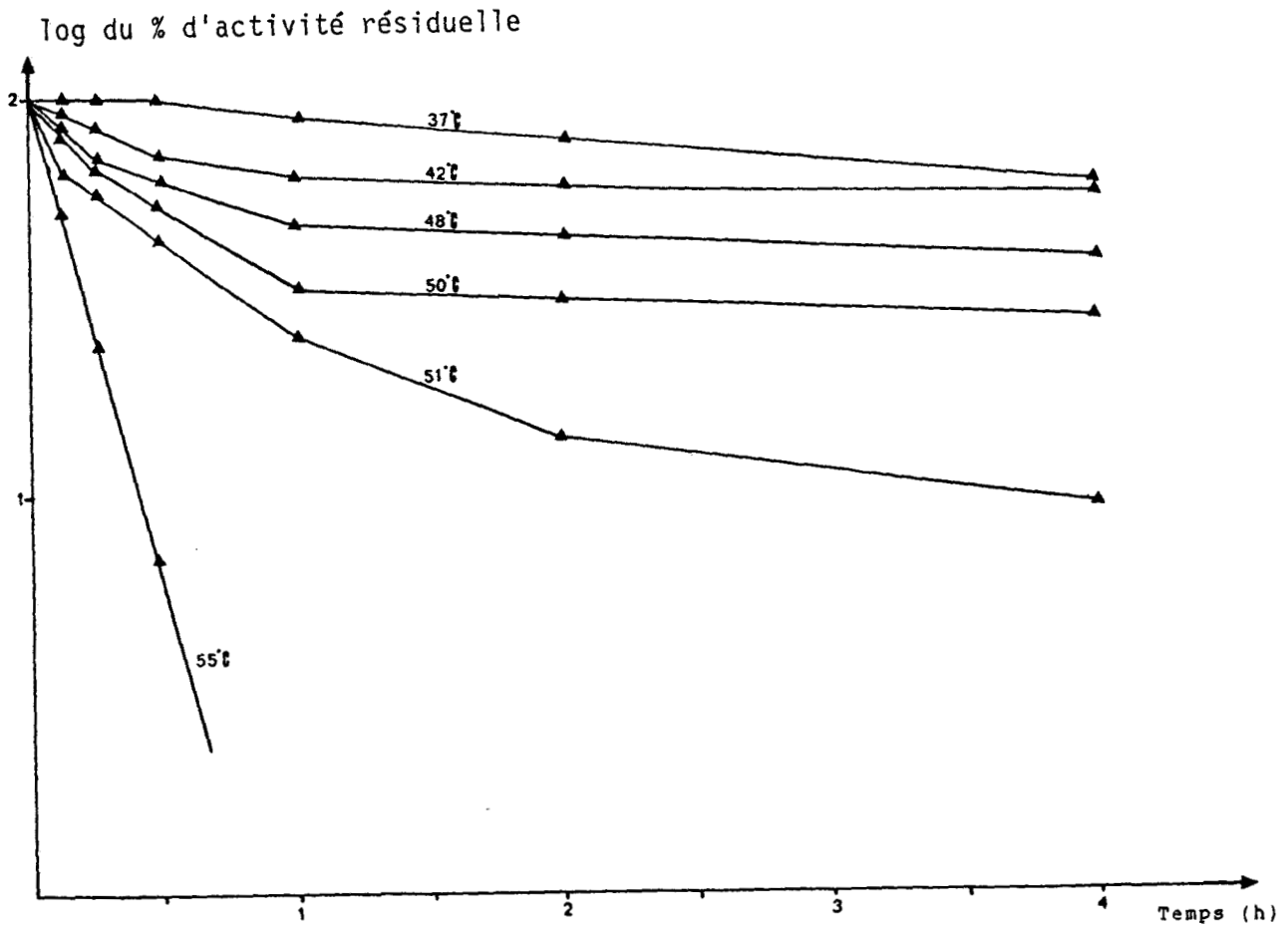


Figure 22: Stabilité à la température de la Neuraminidase

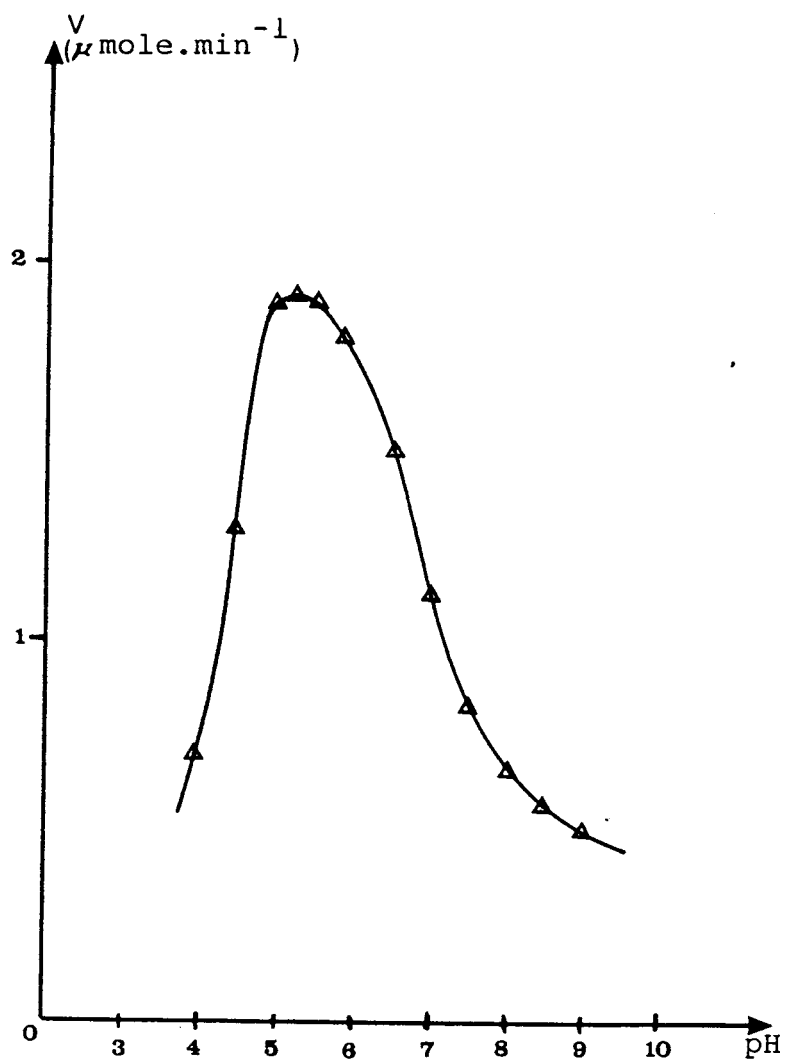


Figure 23: Activité de la Neuraminidase en fonction du pH.

ne forme pas une courbe de Gauss ce qui indique que nous ne sommes pas en présence d'un site d'activité unique. Entre pH 4,5 et 5,5 il y a peu de variation de l'activité, par contre au delà de pH 4 et 8 la neuraminidase a perdu 60 p.100 de son activité sur MU-NeuAc.

c-Détermination de K_M et du V_M sur MU-NeuAc :

La représentation en double inverse de LINEWEAVER et BURK (Figure 24 p.132) permet de déterminer la valeur du K_M égale à $0,13 \text{ mM} \pm 0,01$ et la valeur de la vitesse maximale égale à $0,03 \text{ } \mu\text{mole/min.} \pm 0,002$. La cinétique est de type michaelien classique.

d-Inhibition par l'acide sialique :

La représentation de DIXON (Figure 25 p.133) montre que le produit de la réaction est inhibiteur et que nous sommes en présence d'un inhibiteur de type compétitif dont le K_i est de $4 \text{ mM} \pm 0,2$.

e-Spécificité vis-à-vis de la liaison de la neuraminidase :

Nous n'avons pu déterminer les paramètres cinétiques sur les substrats dont nous disposons. Une cinétique d'hydrolyse de différents types de liaison de l'acide sialique (Figure 26 p.134) montre que la neuraminidase de *Bifidobacterium bifidum* hydrolyse plus vite les liaisons 2,3 puis les liaisons 2,6 et enfin les liaisons 2,8. Le rapport des vitesses d'hydrolyse 2,3/2,6 est de 2,1 et 2,3/2,8 de 11. La vitesse d'hydrolyse est identique sur les glycopeptides, elle est légèrement inférieure quand le substrat est une glycoprotéine.

C-CONCLUSION :

Les résultats que nous avons obtenus peuvent être comparés à ceux de NICOLAI (1981) qui a étudié une neuraminidase de *B. lactentis*. La masse moléculaire que nous avons déterminé par gel d'électrophorèse est voisine de celle obtenue par NICOLAI par gel filtration sur Sephadex G 100 (38.000).

Nous observons d'autre part que les deux enzymes ont des spécificités de liaison identiques et hydrolysent préférentiellement les liaisons 2,3 puis 2,6 et 2,8. De plus, si l'on se réfère à la

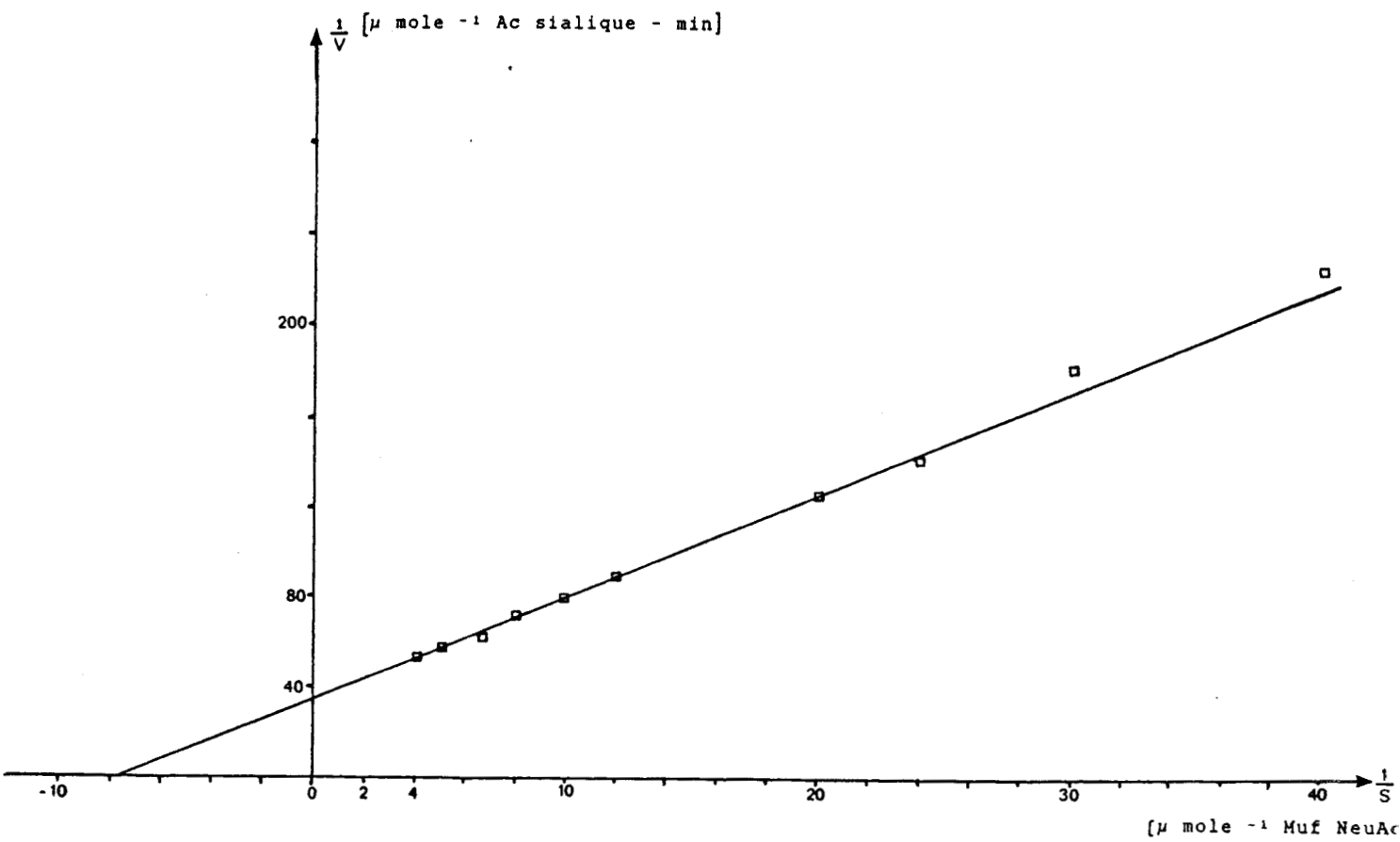


Figure24: Détermination du Km et du Vm

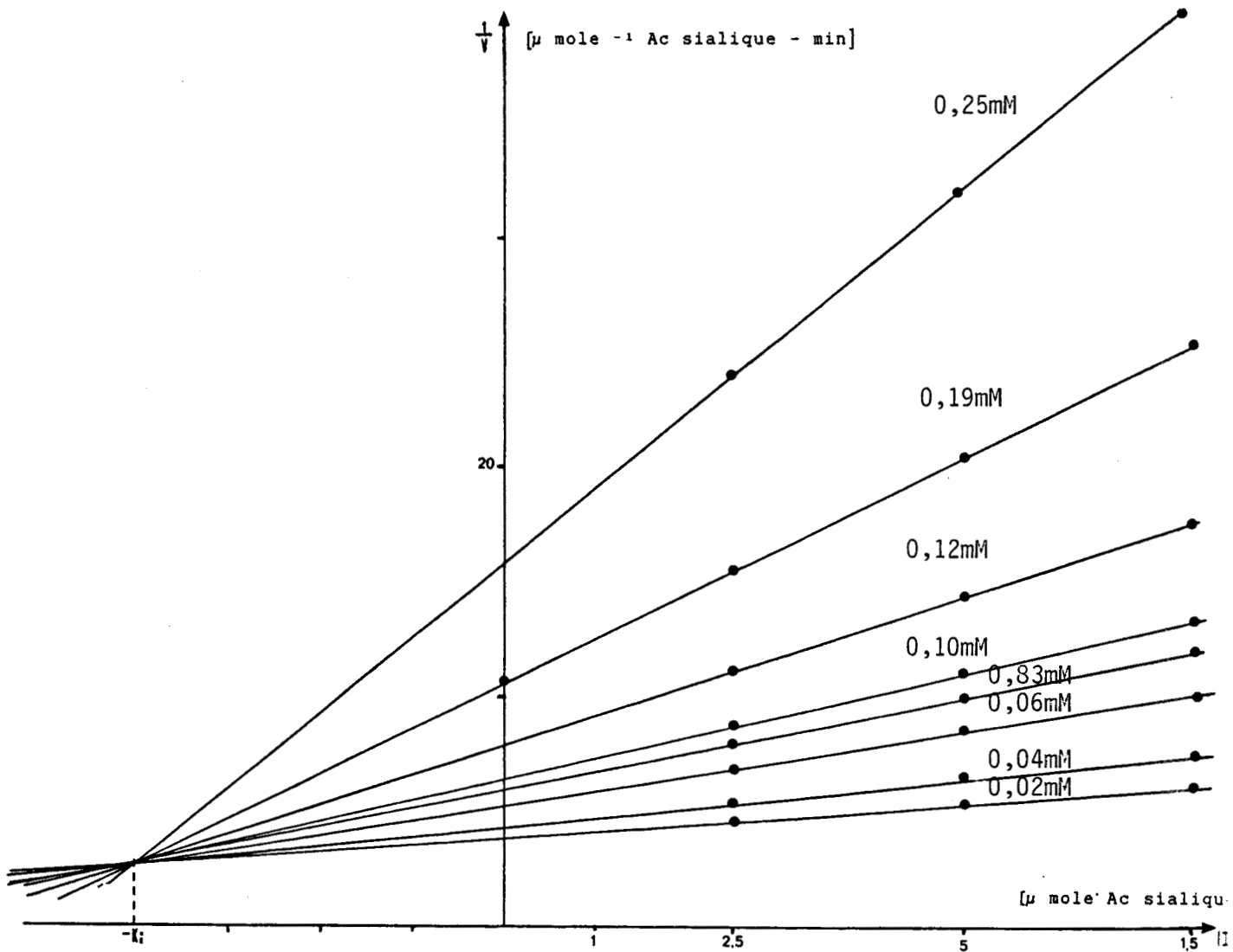


Figure 25: Inhibition de l'activité Neuraminidasique par l'acide sialique.

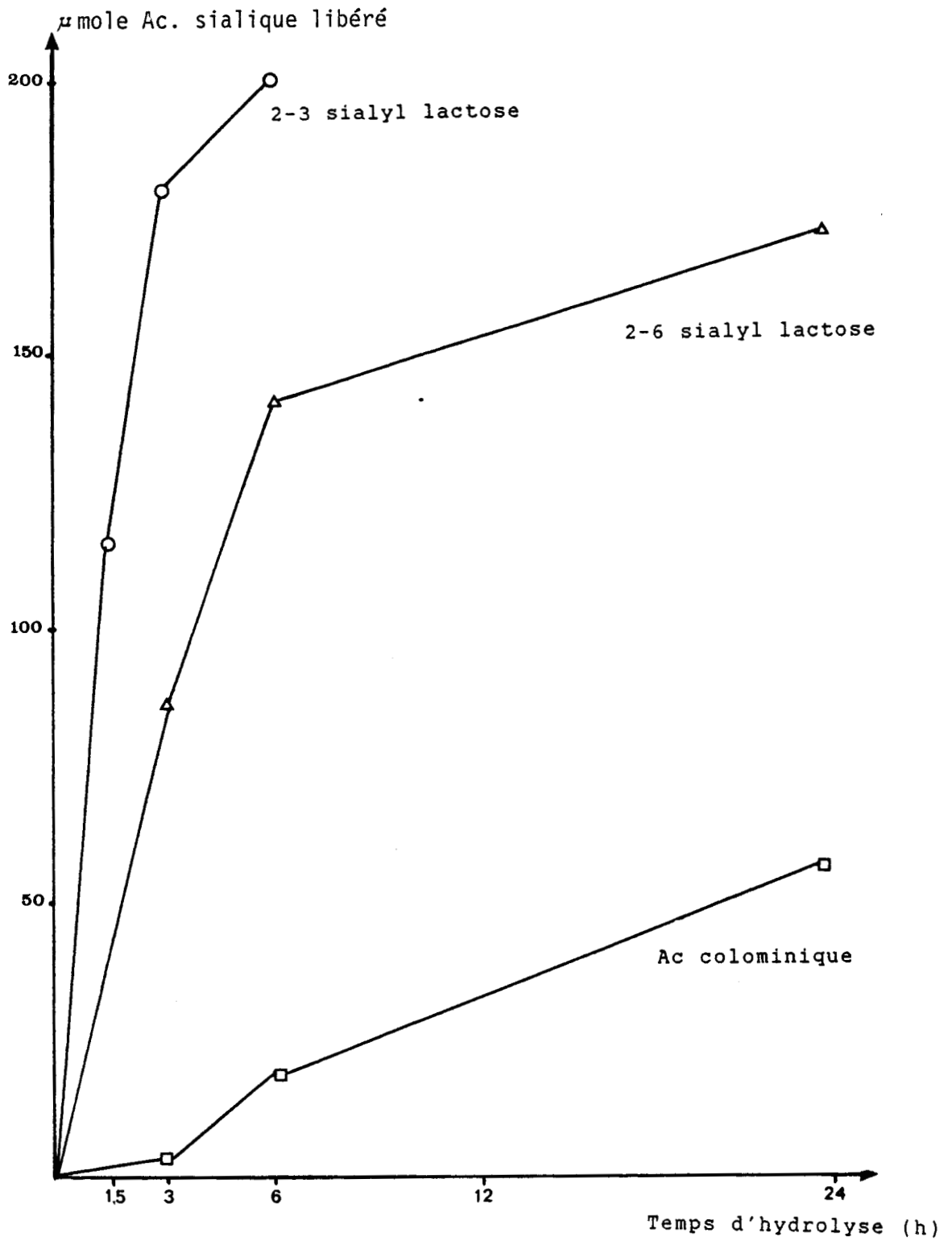


Figure 26: Spécificité d'hydrolyse de liaison de la Neuraminidase

classification donnée par CORFIELD et coll. (1981) où l'un des critères de comparaison des neuraminidases est leur affinité pour les liaisons 2-3 par rapport aux liaisons 2-6, nous pouvons classer la neuraminidase des *B. bifidum* AA 2/2 dans un groupe où l'on retrouve les neuraminidases des microorganismes suivants : *Streptococcus veridans*, *Clostridium perfringens*, *Vibrio cholerae* et *Bifidobacterium bifidum* var. penn. Les deux enzymes perdent leur activité en présence de SDS.

La stabilité à la température est comparable puisque l'on retrouve pour la neuraminidase de *B. lactentis* après 30 minutes d'incubation à 42°C et 50°C respectivement 90 et 10 p.100 d'activité.

Par contre, les températures optimales d'action sont différentes : 55°C pour l'enzyme de *B. bifidum* sur le MU-NeuAc, 37°C pour celle de *B. lactentis* sur le II^oNeuAclac. Enfin, contrairement à la neuraminidase de *B. lactentis*, nous n'avons pas pu mettre en évidence un effet activateur du Ca²⁺ et inhibiteur de l'EDTA, la neuraminidase de *B. bifidum* n'est pas métal dépendante.

CONCLUSION

En conclusion de ce travail, nous allons rappeler les principaux résultats que nous avons obtenus et envisager les perspectives de travail.

Notre premier souci était la production en masse de corps bactériens, afin de disposer d'un matériel de départ suffisant pour pouvoir aborder l'étude du système glycosidasique de *B. bifidum* AA/22. Nous avons dû résoudre deux problèmes :

- dans un premier temps, l'optimisation de la production d'enzymes par fermentation du microorganisme; les conditions de culture que nous avons utilisées ne nous ont pas permis d'obtenir des quantités suffisantes (inférieures à 5 p.100) d'enzymes excrétées qui auraient pu être représentatives du matériel enzymatique de *B. bifidum*.
- dans un second temps, nous avons donc optimisé l'extraction des enzymes du microorganisme.

La production d'enzymes cellulaires doit intégrer deux paramètres: la biomasse (poids de cellules) par litre de culture et la concentration en enzymes de la bactérie. Nos résultats, d'abord obtenus par culture en flacon de pénicilline et confirmés en fermenteur sur un milieu complet bouillon cerveau coeur, nous ont permis d'établir les conditions suivantes pour une fermentation à 37°C :

- le pH optimal de culture est voisin de 6,8
- la durée de fermentation est fixée à 35 heures
- la concentration en bouillon cerveau/coeur doit être de 37 g/l
- dans ces conditions l'addition de glucose jusqu'à 30 g/l augmente toujours la biomasse produite, mais la concentration en enzyme cellulaire reste sensiblement constante. Cependant, pour des raisons techniques, nous avons fixé la concentration en glucose à 10 g/l.

Nous avons mis en évidence un phénomène d'induction : en effet, l'addition de facteur bifidigène sous forme de lait de Femme et plus particulièrement l'addition des facteurs glucidiques (gynolactose) augmente la concentration en β -D-galactosidase, N-acétyl- β -D-glucosaminidase, α -D-neuraminidase et α -L-fucosidase. Dans un milieu

contenant 37 g de BCC, 10 g de glucose, 1 g de gynolactose ou 66 ml de lait de Femme, nous obtenons par litre de milieu : 2,5 g de matière sèche cellulaire, soit 4.600 U de β -D-galactosidase, 770 U de N-acétyl- β -D-glucosaminidase, 80 U d' α -D-neuraminidase et 120 U d' α -L-fucosidase après extraction aux ultra-sons.

Après centrifugation les cellules sont transférées dans un tampon phosphate de sodium 20 mM pH 6,8 contenant 30 p.100 de glycérol et elles sont stockées à -80°C.

En ce qui concerne l'extraction des activités enzymatiques, nous avons choisi le traitement par ultra-sons des cellules de *B. bifidum* dans un tampon phosphate de sodium 200 mM pH 6,8 contenant 1 mM d'EDTA et 0,1 p.100 de détergent (Nonidet P 40). La concentration optimale en cellules doit être de 3,7 g de cellules sèches par litre de tampon d'extraction, pour un temps de traitement de 5 minutes. La température a été maintenue entre 0 et 10°C. L'utilisation d'un moyen d'extraction énergétique est nécessaire, en effet les enzymes sont en grande partie membranaires : par traitement à la presse de French 71 p.100 de β -D galactosidase, 86 p.100 de N-acétyl- β -D-glucosaminidase, 99 p.100 d' α -D-neuraminidase et 88 p.100 d' α -L-fucosidase restent insolubles. L'utilisation conjointe des ultra-sons et de détergents fait passer la fraction insoluble à 20 p.100 pour la β -D-galactosidase, 30 p.100 pour la N-acétyl- β -D-glucosaminidase, 54 p.100 pour l' α -D-neuraminidase et 47 p.100 pour l' α -L-fucosidase.

Nous avons d'autre part vérifié que ces conditions ne modifiaient pas la masse moléculaire des enzymes en solution (entre 40 et 100 kDa), en provoquant notamment la formation de micelles non spécifiques et aléatoires qui auraient gêné l'obtention de résultats reproductibles lors de la purification de ces enzymes.

Ces paramètres de culture et d'extraction nous ont permis d'obtenir par litre de culture 800 mg de protéines renfermant 5.600 U de β -D-galactosidase, 1.280 U de N-acétyl- β -D-glucosaminidase, 75 U d' α -D-neuraminidase et 300 U d' α -L-fucosidase.

Les substrats que nous avons utilisés dans ce travail et dans celui de L APPOURCHAUX possèdent des structures que l'on retrouve au niveau du lait de Femme. D'autre part les essais d'hydrolyse de glycopeptides et de glycoprotéines du lait de Femme ont pu être menés avec succès avec les exoglycosidases de *B. bifidum* souche AA 2/2. Celui-ci

possède donc bien l'arsenal enzymatique qui lui permet de dégrader les oligosaccharides du lait.

L'activité α -D-neuraminidasique de *B. bifidum*, outre les applications qu'elle peut avoir dans l'étude des structures des glycoprotéines, se distingue des autres activités glycosidasiques tant par sa localisation (99 p.100 de cette activité est membranaire) que par sa stabilité lors de l'extraction. C'est pourquoi notre étude a porté sur la purification et la caractérisation de cette activité.

La première étape de purification chromatographique sur Hydroxylapatite Ultrogel donne deux fractions enzymatiques contenant une activité α -D-neuraminidasique. Nous avons étudié celle qui ne contient que cette activité glycosidasique et représente 40 p.100 de l'activité de départ. La seconde fraction contenant de l'activité α -D-neuraminidasique a été étudiée par APPOURCHAUX. L'utilisation d'une chromatographie d'échanges d'anions (MonoQ Pharmacia) et d'interaction hydrophobe (Octyl Sepharose Pharmacia) nous a permis de purifier 240 fois notre activité avec un rendement de 20 p.100. Nous obtenons ainsi une solution contenant 22 U d' α -D-neuraminidase par mg de protéines.

Cette fraction purifiée est homogène en gel d'électrophorèse dénaturante (SDS), en chromatographie de gel filtration (Superose 12, Sepharose CL 6B) et en chromatofocalisation (MonoP). L'enzyme semble être composée de deux sous-unités puisque, d'une part, nous obtenons une masse moléculaire native par gel filtration voisine de 75 kDa et une masse moléculaire en électrophorèse dénaturante de 35 kDa, et d'autre part les études de stabilité à la température font apparaître des cinétiques de dégradation parfois caractéristiques de systèmes binaires. Il ne nous a cependant pas été possible de visualiser par gel filtration la séparation des deux sous-unités en utilisant des détergents. A noter enfin en ce qui concerne les caractéristiques physico-chimiques que le pHi est de 4,2.

L'étude des propriétés enzymatiques de cette enzyme nous a permis d'en préciser les conditions d'utilisation. Le pH optimum d'action est compris entre 5 et 6, la température optimale d'hydrolyse est de 50°C, bien que l'enzyme ne soit pas stable pour des températures supérieures à 40°C en absence de substrat. L'activité α -D-neuraminidasique est inhibée par le produit de sa réaction : la constante d'inhibition de l'acide sialique est de 4 mM. Ce n'est pas une enzyme métal dépendante, l'EDTA, le Ca^{2+} , le Mg^{2+} , le Mn^{2+} , le Co^{2+} et le Cu^{2+} n'ont pas d'effet sur son activité. L' α -D-neuraminidase de *B. bifidum* AA/22 est active sur les glycopeptides comme sur les glycoprotéines mais sa vitesse d'hydrolyse est

alors plus faible. Elle hydrolyse préférentiellement les liaisons α 2,3 puis les liaisons α 2,6 et α 2,8. Enfin les valeurs du V_{max} et du K_M sur l'acide 4-méthyl umbelliféryl N-acétylneuraminique sont de l'ordre de 0,03 μ mole/min et de 0,13 mM.

B. bifidum est susceptible de protéger le nourrisson contre l'implantation à de hauts niveaux de bactéries pathogènes. Jusqu'à présent on justifie la présence d'un potentiel important des activités glycosidasiques par le fait qu'elles sont susceptibles de dégrader les structures oligosaccharidiques présentes dans la fraction bifidigène du lait de Femme (le gynolactose). Cependant il reste que le mécanisme d'action de ces facteurs reste inexpliqué, tant par leurs origines très diverses que par leurs structures très variées. La mise en oeuvre et l'étude des glycosidases de *B. bifidum* sur des substrats glucidiques ou des facteurs bifidigènes pourrait permettre de synthétiser un facteur de croissance unique.

Il reste à mesurer l'efficacité de ces facteurs, et il faut aussi admettre que d'autres facteurs de croissance existent qui ne sont pas de nature glucidique. On ne peut donc invoquer le rôle de barrière à l'implantation des bactéries pathogènes par le seul phénomène de l'augmentation de croissance des Bifidobactéries. Peut-être faut-il voir un phénomène d'obstruction à l'implantation des autres bactéries au niveau de la muqueuse intestinale. GOMEZ *et al.* (1988) ont suggéré que les productions exocellulaires de culture de *B. adolescentis* modifiaient *in vitro* la réponse immunitaire de splénocytes murins. Les Bifidobactéries pourraient également posséder un arsenal enzymatique de façon à dégrader plus ou moins profondément les mucines de l'intestin afin de dégager des structures susceptibles de se lier à des récepteurs bactériens de type lectinique. Une étude sur modèle animal ou cellulaire devrait permettre de répondre à cette question. Cette action, si elle existe, ne permet pas d'expliquer pourquoi au moment du sevrage il y a disparition de *B. bifidum*; existe-t-il un changement de structure des mucines intestinales lors de l'alimentation au lait de Femme, comme le suggère SHEARD (1988), ou bien la ration alimentaire de l'enfant ne permet-elle plus la biosynthèse de facteur d'adhésion ?

Le problème reste entièrement posé, il serait nécessaire pour tenter de le résoudre d'étudier l'écologie des populations bactériennes au niveau des muqueuses intestinales. Quoiqu'il en soit, pour le moment *B. bifidum* AA/22 est une source intéressante pour la production de systèmes enzymatiques au niveau laboratoire.

BIBLIOGRAPHIE

ADAM, A., 1921

Z. Kinderheilk, 29, 306-320

über Darmbakterien III. über den Einfluß der H Ionenkonzentration des Nährbodens auf die Entwicklung des *Bacillus bifidus*.

ADAM, A., 1925

Die Entstehung der Bifidusvegetation.

Jb. Kinderheilk, 110, 186-196

ADAM, A., 1949

M Schr. Kinderheilk, 97, 500-507

(Substitute for human milk in infant feeding. A contribution to the establishment of an artificial bifidus flora).

AUDEH, J., GRUNER, J., NUESCH, J., KNUSEL, F., 1967

Path. Microbiol., 30, 858-866.

Some statistical methods in nutrient medium optimisation

BAUER, H., SIGALAKIE, E., FAURE, J.C., 1975

Can. J. Microbiol., 21, 1305-1316

BEERENS, H., ROMOND, Ch., NEUT, C., 1980

Am. J. Clin. Nutr., 33, 2424-2439

Influence of breast-feeding of the bifid flora of new born intestine

BENNO, Y., SAWADA, K., MITSUOKA, T., 1984

Microbiol. Immun., 28, 975

The intestinal microflora of infants : composition of fecal flora in breast-fed and bottle-fed infants.

BENNO, Y., SAWADA, K., MITSUOKA, T., 1985

Microbiol. Immun., 29 (3), 243-250

The intestinal microflora of infants : fecal flora of infants with vitamin K deficiency.

BESSAU, G., 1937

M Schr. Kinderheilk, 68, 297

Die Physiologie der künstlichen Ernährung.

BESSAU, G., 1938

Dtsch. Med. Wschr., 64, 12

BESSAU, G., 1943

M Schr. Kinderheilk, 92, 137-171

Die künstliche Ernährung des Säuglings.

BEZIRTZOGLU, E., 1985

Thèse de Paris sud

Contribution à l'étude de l'implantation de la flore fécale anaérobie du nouveau né mis au monde par césarienne.

- BEZKOROVAINY, A., GROHLICH, D., NICHOLS, J.H., 1979**
Amer. J. Clin. Nutr., 32, 1428-1432
Isolation of a glycopeptide fraction with *Lactobacillus bifidus* subspecies *pennsylvanicus* growth promoting activity from whole human milk casein
- BEZKOROVAINY, A., TOPOUZIAN, N., 1981**
Int. J. Biochem., 13, 585-590
B. bifidus var. *Penn.* growth promoting activity of human milk casein and its derivatives
- BEZKOROVAINY, A., TOPOUZIAN, N., 1983**
Int. J. Biochem., 15 (3), 361-366
Aspects of iron metabolism in *B. bifidum* var. *Penn.*
- BEZKOROVAINY, A., TOPOUZIAN, N., MILLER-CATCHPOCK, K., 1986**
Clin. Physiol. Biochem., 4, 150-158
Mechanisms of ferric and ferrous iron uptake by *Bifidobacterium bifidum* var. *Pennsylvanicus*
- BIAVATI, B., CASTAGNOLI, P., CROCIANI, F., TROVATELLI, L.D., 1984**
Microbiol., 7, 341-345
Species of *Bifidobacterium* in the feces of infants
- BIAVATI, B., SCARDOVI, V., MOORE, W.E.C., 1982**
Int. J. Syst. Bacteriol., 32 (3), 358-373
Electrophoretic patterns of proteins in the genus *Bifidobacterium* and proposal of four new species
- BLAUROCK, G., 1937**
Mschr. Kinderheilk, 68, 304-309
Zur Physiologie der Bifidusbakterien.
- BOURNE, K.A., BEEBE, J.L., LUE, Y.A., ELLNER, P.D., 1978**
Yale J. Biol. Med., 51, 505-512
Bacteremia due to *Bifidobacterium*, *Eubacterium* or *Lactobacillus*; twenty one cases and review of the literature
- BOURRILLON, A., BOUSSOGANT, Y., LEJEUNE, C., BAILLERET, F., 1980**
In "Les anaérobies" (Symposium Paris) Ed. MASSON, 96-107
Etablissement et cinétique des anaérobies dans la flore fécale du nouveau né
- BRADFORD, M., 1976**
Anal. Biochem., 72, 248-254
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding

BUCHANAN, R.E., GIBBONS, M.E., 1974

In "Bergey's manual of determinative bacteriology", 8th ed. WILLIAMS et WILKENS Co., Baltimore, USA

BULLEN, C.L., TEARLE, P.V., STEWART, M.G., 1977

J. Med. Microbiol., 10, 403-413

The effect of "humanised" milks and supplemented breast-feeding on the faecal flora of infants

BURNETTE, V.H., 1981

Anal. Biochem., 112, 195-203

"Western blotting" : electrophoretic transfert of proteins from sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibodies and radioionised protein A

BUTZ, W.P., HABICHT, J.P., DAVANZO, J., 1984

Am. J. Epidemiol., 119 (4), 516-525.

Environnemental factors in the relationship between breast feeding and infant mortality : the role of sanitation and water in Malaysia.

CARILLO, M., ESTRADA, E., HAZEN, T.C., 1985

Appl. Environ. Microbiol., 50 (2), 468-476

CORFIELD, A.P. MICHALSKI, J.C., SHAVER, R., 1981

Perspectives in inherited metabolic diseases, 4, 3-70

The substrate specificity of sialidases from microorganisms and mammals.

CORTHIER, G., DUBOST, F., RAIBAUD, P., 1985

Appl. Environ. Microbiol., 49, 250-252

Modulation of cytotoxin production by *Clostridium difficile* in the intestinal tracts of gnotobiotic mice inoculated with various human intestinal bacteria

CUMMINS, C.S., GLENDENNING, O.M., HARRIS, H., 1957

Nature, 180, 337-338

Composition of the cell wall of *Lactobacillus bifidus*

CRUISCHANK, R., 1925

J. Hyg., 24, 241-254

Bacillus bifidus : its characteristics and isolation from the intestine of infants.

DEGUSHI, Y., MORISHITA, T., MUTAI, M., 1985

Agr. Biol. Chem., 49 (1), 13-19

Comparative studies in synthesis of water soluble vitamins among human species of Bifidobacteria

DEHNERT, J., 1957

Zbl. Bakt., 169, 66-83

DELTHIL, P., 1953

Sem. Hôp. Paris, 29, 2335-2443

Le lactose dans l'alimentation des nourrissons.

DE VRIES, W., GERBRANDY, S.J., STOUTHAMER, A.H., 1967

Biochem. Biophys. Acta, 136, 415-425

Carbohydrate metabolism in *Bifidobacterium bifidum*

DE VRIES, W., STOUTHAMER, A.H., 1967

J. Bact., 93 (2), 574-576

Pathway of glucose fermentation in relation to the taxonomy of Bifidobacteria

DE VRIES, W., STOUTHAMER, A.H., 1968

J. Bact., 96 (2), 472-478

Fermentation of glucose, lactose, galactose, mannitol and xylose by Bifidobacteria

DE VRIES, W., STOUTHAMER, A.H., 1969

Arch. Mikrobiol., 65 (3), 275-287

Factors determining the degree of anaerobiosis of *Bifidobacterium* strains

DRASAR, B.S., HILL, M.J., 1974

In "Human intestinal flora", Academic Press, London, New York, San Francisco

DUFFY, L.C., BYERS, T.E., RIEPENHOFF-TALTY, M., LA SCOLEA, L., ZIELEZNY, M., OGRA, P.L., 1986

Am. J. Public Health, 76 (3), 259-263

The effects of infant feeding on rotavirus induced gastroenterities : prospective study.

DÜSTERVALD, W., KASTNER, W., MÜLLER, H., 1950

Med. Klin., 45 (36), 1143-1146

(New bifidusproducing food mixtures for infants during the first months of life.)

FRACHEM, R.G., KOBLINSKY, M.A., 1984

Bull. WHO, 62 (2), 271-291

Interventions for the controls of the diarrheal disease among young children : promotion of breast feeding.

FINCH, P.R., YUEN, R., SCHACHTER, H., MOSCARELLO, M.A., 1969

Anal. Biochem., 31, 296-305

Enzymatic method for micro assay of D mannose, D glucose, D galactose and L fucose from acid hydrolyzates of glycoproteins

FINKELSTEIN, R.A., SCIORTINO, C., MAC INTOSCH, M.A., 1983

Rev. Infect. Dis., 5 (4),

Rôle of iron in microbe-host interactions

FRISSELL, E., 1951

Acta Paediatr., Stockholm, 40 suppl. 80, 1-123

Studies on *Bacterium bifidum* in healthy infants.

GAUHE, A., GYORGY, P., HOOVER, J.R.E., KUHN, R., ROSE, C.S., RUELIIUS, H.W., ZILLIKEN, F., 1954

Arch. Biochem. Biophys., 48, 214-224

Bifidus factor IV : preparations obtained from human milk.

GERSTLEY, J.R., HOWELL, K.M., NAGEL, B.R., 1932

Amer. J. Dis. Child, 43, 555-565

Some factors influencing the fecal flora of infants.

GLICK, M.C., SALL, T., ZILLIKEN, F., MUDD, D., 1960

Biochem. Biophys. Acta, 37 (2), 363-365

Morphological changes of *L. bifidus* var. *Penn* produced by cell-wall precursor

GONCHAROVA, G.I., SEMENOVA, L.P., KOZLOVA, E.P., LIANNOIA, D.M., 1979

Vopr. Pitan., 6, 49-53

Effects of different types of newborn infant feeding on intestinal microbiocenosis

GOTTSCHALK, G., 1979

In "Bacterial metabolism", Ed. SPRINGER, New York, Heidelberg, Berlin, 173-178

GRIMMONPREZ, L., 1972

Thèse de Docteur es Sciences de l'université de Lille

Etude des glucides du lait de Femme

GRIMMONPREZ, L., MONTREUIL, J., 1968,

Bull. Soc. Chim. Biol., 50, 843-848

Etude physicochimique de 6 nouveaux oligosides isolés du lait de Femme

GRIMMONPREZ, L., MONTREUIL, J., 1975

Biochimie, 57, 695-701

Isolement et étude des propriétés physico-chimiques d'oligosaccharides du lait de Femme

GOMEZ, E., MELGAR, M.M., PEREZ SILVA, G., PORTOLES, A., GIL, I., 1988

FEMS Microbiol. Lett., 56, 47-52

Exocellular products from *Bifidobacterium adolescentis* as immunomodifiers in the lymphoproliferative responses of mouses splenocytes.

GOMORI, G., 1955

In "Methods in enzymology", COLOWICK, S.P., KAPLAN, N.O. eds, 1955, vol. 1, 138-146, Academic press, New York

- GYLLENBERG, H., ROSSANDER, M., ROINE, P., 1954**
Acta Chem. Scand., 8, 133-134
On the growth inhibition of *Lactobacillus bifidus* by certain fatty acids.
- GYLLENBERG, H., ROSSANDER, M., ROINE, P., 1956**
Acta Paediat. Stockh., 45, 147-160
Fatty acids of human milk and cow's milk on intestinal lactobacilli.
- GYORGY, P., JEANLOZ, R.W., VON NICOLAI, H., ZILLIKEN, F., 1974**
Eur. J. Biochem., 43, 29-33
Undialysable growth factors for *Lactobacillus bifidus* var. Penn.
- GYORGY, P., KUHN, R., ROSE, C.S., ZILLIKEN, F., 1954**
Arch. Biochem. Biophys., 48, 202-208
Bifidus factor II : its occurrence in milk from different species and in other natural products.
- GYORGY, P., MORRIS, R.F., ROSE, C.S., 1954**
Arch. Biochem. Biophys., 48, 193-201
A variant of *Lactobacillus bifidus* requiring special growth factor.
- GYORGY, P., ROSE, C.S., 1955**
Proc. Soc. Exp. Biol., 90, 219-223
Microbiological studies on growth factor for *L. bifidus* var. pennsylvannicus.
- GYORGY, P., ROSE, C.S., 1955**
J. Bact., 69, 483
Further observations on metabolic requirement of *Lactobacillus bifidus* var. *Pennsylvanicus*
- HABU, Y., HAGAOKA, M., YOKOKURA, T., HAZIMA, I., 1987**
J. Biochem., 102, 1423-1432
Structural studies of cell wall polysaccharides from *Bifidobacterium bifidum* breve YIT 4010 and related *Bifidobacterium* species
- HÄHNEL, H., MULLER BENTHOW, W., GRÜTTE, F.K., 1970**
Zbl. Bakt., 215, 333-337
Faecal microecology of the young infant in relation to nutrition : composition of microflora.
- HASSINEN, J.B., DURBIN, G.T., TOMARELLI, R.M., BERNHART, F.W., 1951**
J. Bact., 62, 771-777
The minimal nutritional requirements of *Lactobacillus bifidus*
- HAWKSWORTH, G., DRASAR, B.S., HILL, M.J., 1971**
J. Med. Microbiol., 4, 451-459
Intestinal bacteria and the hydrolysis of glycosidic bonds

HIRANO, S., HAYASHI, H., TIRABAYASHI, T., ONODERA, K., ISEKI, S., KOCHIBE, N., NAGAI, Y., NAKASAKI, T., IMAGAVA, T., 1968

J. Biochem., 64, 563-565

Biologically active glycopeptides in human colostrum

HOFFMANN, K., 1966

In "Theoretische und klinische Medizin in Einzeldarstellungen", Dr. Alfred Hütlug, Heidelberg

Bakterielle Besiedlung des Menschlichen Darmes

HOFFMANN, K., MOSSSEL, D.A.A., KORUS, W., VAN DE KAMER, J.H., 1964

Klin. Wschr., 42, 126-130

(Mode of action of lactulose in the intestine).

HOMMA, H., KOHNO, M., 1960

Shonika kinsho, 13, 1272-1274

Effect of the metabolites of *Escherichia coli* on the growth of *L. bifidus*

KANDLER, O., 1970

Int. J. Syst. Bact., 20, 491-508

Amino acid sequence of the murein and taxonomy of the genera *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc* and *Pedicoccus*

KANDLER, O., KOCH, D., SCHLEFER, K.H., 1968

Arch. Mikrobiol., 61 (1), 181-186

(Amino acid sequence of glycine containing murein of some strains of *L. bifidus*)

KANDLER, O., LAUER, E., 1974

Zbl. Bakt., 228, 29-45

(Modern concepts of taxonomy of Bifidobacteria)

KEHAGIAS, C., JAO, Y.C., MIKOLAJCIK, E.M., HANSEN, P.M.T., 1977

J. Food Sci., 42, 146-160

Growth response of *B. bifidum* to a hydrolytic product isolated from bovin casein

KLEINSCHMIDT, H., 1949

österr. Z. Kinderheilk, 3, 55

KOJIMA, M., SUDA, S., HOTTA, S., HAMADA, K., 1968

J. Bact., 95 (2), 710-711

Induction of pleomorphism in *Lactobacillus bifidus*

KOJIMA, M., SUDA, S., HOTTA, S., HAMADA, K., 1970

J. Bact., 102, 217-220

Induction of pleomorphology and calcium ion deficiency in *Lactobacillus bifidus*

KUROMIYA, R., 1960

Ochamomizu Igaku Zasshi, 8, 88-102

(The study of the effect of underlike substances especially carrot powder in dispeptic infants)

LAMBERT, R., SAITO, Y., VEERKAMP, J.H., 1965

Arch. Biochem. Biophys., 110, 341-345

Incorporation of labeled derivatives of 2 deoxy-2-amino-D-glucose into the cell walls of *Lactobacillus bifidus* var. *Pennsylvanicus*

LAMBERT, R., ZILLIKEN, F., 1965

Arch. Biochem. Biophys., 110, 544-550

Novel growth factor for *Lactobacillus bifidus* var. *Pennsylvanicus*

LAUER, E., KANDLER, O., 1976

Arch. Mikrobiol., 110, 271-277

Mechanismus der Variation des Verhältnisses Acetat/Lactat bei der Vergärung von Glucose durch Bifidobakterien

LEE, L.J., KINOSHITA, S., KIMAGAI, H., TOCHIKURA, T., 1980

Agric. Biol. Chem., 44 (12), 2961-2966

Galactokinase of *Bifidobacterium bifidum*

LEVESQUE, J., 1959

Sem. Hôp. Paris, 35, 237-239,

Aspect général du rôle du *Bacillus bifidus* chez les enfants.

LINEWAVER, H., BURK, D., 1934

J. Am. Chem. Soc., 56, 658-666

The determination of enzyme dissociation constants

LUGOVSKAIA, R.K., LADODO, K.S., 1984

Vopr. Pitan., 4, 29-33

Comparative evaluation of intestinal microflora in infants on artificial feeding with various milk formulas

MALICK, L.E., WILSON, B.V., 1975

Stain Technology, 50 (4), 265-269.

Modified thiocarbonylhydrazide procedure for scanning electron microscopy : routine use for normal pathological or experimental tissues.

MALYOTH, G., 1949

Ann. Paediatr., 173, 34-50

über Dextrin-Maltose-Gemische als Zucker für Säuglinge.

MALYOTH, G., KIRINLIDIS, S., 1939

Klin. Wschr., 18, 1240-1270

MALYOTH, G., STEIN, H.W., 1953

Klin. Wschr., 31, 36-38

Zur Kenntnis des Milchzuckers

MANCIAUX, L., 1958

Thèse d'Université de Nancy, Médecine

Bifidobacterium bifidum. Ses facteurs de croissance. Essais d'implantation chez le nourrisson.

MATTEUZZI, D., CROCIANI, F., ENALDI, O., 1978

Ann. Microbiol., 129 (2), 175-182

Amino acids produced by Bifidobacteria and some Clostridia

MILLER, T.L., WOLIN, M.J., 1974

Appl. Microbiol., 27 (5), 985-987

A serum bottle modification of the hungate technic for cultivation obligate Anaerobes.

MITSUOKA, T., 1969

Zbl. Bakt., 210, 32-51

Vergleichende Untersuchungen über die Laktobazillen aus den Faeces von Menschen, Schweinen und Hühnern

MITSUOKA, T., 1974

Jap. J. Bact., 29 (6), 773-788

(Studies on intestinal flora)

MITSUOKA, T., 1984

Die Nahrung, 28, 619-625

Einfluß der Ernährung auf die Darmflora

MITSUOKA, T., 1984

Bifidobacteria Microflora, 3 (1), 11-28

Taxonomy and ecology of Bifidobacteria

MITSUOKA, T., HAYAKAWA, K., 1972

Zbl. Bakt. Hyg., 223, 333-342

Die faekal Flora bei Menschen I

MITSUOKA, T., HAYAKAWA, K., KIMURA, N., 1974

Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. A., 226, 469-478

Die faekal Flora bei Menschen II mitteilung : die zusammensetzung der Bifidobakterien-flora der verschiedenen Altersgruppen.

MONTREVIL, J., 1957

Bull. Soc. Chim. Biol., 39, 395

Les glucides du lait de Femme.

MORBAU, M.C., THOMASSON, M., DUCLUZEAU, R., RAIBAUD, P., 1986

Reprod. Nutr. Develop., 26 (2B), 745-753

Cinétique d'établissement de la microflore digestive chez le nouveau-né humain en fonction de la nature du lait

MORO, E., 1900

Jb. Kinderheilk, 52, 38

über *B. acidophilus*

MORO, E., 1907

M Schr. Kinderheilk, 6, 550-563

Weitere Untersuchungen betreffend die endogene Infektion des Säuglingsdarmes.

WEIMANN, N., DE LAVERGNE, E.V., PIERSON, M., MANCIAUX, M., 1959

Pediatrie, 14, 837

Le bifidus et ses facteurs de croissance

NEUT, C., LESIEUR, V., BEERENS, H., ROMOND, C., 1985

Microecology Therapy, 15, 303

Changes in the composition of faecal flora during weaning

NEUT, C., ROMOND, C., BEERENS, H., 1981

Rev. Inst. Pasteur Lyon, 14, 19-26

Identification des *Bifidobacterium* en fonction de leurs besoins nutritionnels

NEUT, C., SEKA ASSY, N., ROMOND, C., MIZON, J., BEERENS, H., 1984

Rev. Inst. Pasteur, 17, 1-11

Extraction à partir du lait maternel de facteurs de croissance spécifiques à *B. bifidum*

NICHOLS, I.H., BEZGOROVAINY, A., LANDU, W., 1974

Life Sci., 14, 967-976

Human colostrum whey M-1 glycoproteins and their *L. bifidus* var. *Penn.* growth promoting activities

NICOLAI VON, H., 1971

Thèse Université de Bonn

Untersuchungen zur biologischen Funktion Sialinsäure haltigen Oligosaccharide aus Frauenmilch

NICOLAI VON, H., ZILLIKEN, F., 1972

Hoppe Seyler's Z. Physiol. chem., 353, 1015-1016

Neuraminidase from *Bifidobacterium bifidum* var. *Pennsylvanicus*

NORRIS, R.F., FLANDERS, T., TOMARELLI, R.M., GYORGY, P., 1950

J. Bact., 60, 681-696

The isolation and cultivation of *Lactobacillus bifidus*

O'BRIEN, P.J., GLICK, M.C., ZILLIKEN, F., 1960

Biochem. Biophys. Acta, 37, 357-360

Acid aminosugars from bacteria. Incorporation of C¹⁴ alpha, beta, methyl, N acetyl D glucosaminide into muramic acid

OHTA, K., HOMMA, N., KOYAMA, T., ICHIHASHI, Y., NIKI, T., URANO, T.,
SAKASHITA, A., OHSHIMA, Y., 1971

Acta Paed. Jpn., 75, 1003-1016

Effect of pantethine on growth of Bifidobacteria in the intestines of
bottle-fed infants

OISHI, Y., 1966

Bull. Kobe Med. Coll., 28, 48-56

(Studies of infant nutrition with special reference to fat responsible for
the growth of *Lactobacillus bifidus*.)

OVERMAN, J.R., PINE, L., 1963

J. Bact., 86, 656-665

Electromicroscopy of cytoplasmic structures in facultative and anaerobies
Actinomyces

PETUELY, F., 1957

Verlag Notring der Wissenschaftlichen Verbände Biochemische
untersuchungen zur Regulation der Dickdarmflora des Sauglings.

PETUELY, F., 1957

Z. Kinderheilk, 79, 174-179

Bifidus Flora bei flaschen Kindern durch bifidogene Substanzen (Bifidus
faktor)

PETUELY, F., 1966

U.S. Pat., 3, 239-358

Bifidus active substance and bifidus active food preparations.

PETUELY, F., KRISTEN, G., 1949

Ann. Paediat., 172, 183-184

(Changing the intestinal flora of infants).

POLONOVSKI, M., LESPAGNOL, A., 1930

C. R. Soc. Biol., 104, 553-555

Un nouveau constituant du lait de Femme : le gynolactose.

POUPARD, J.A., HUSAIN, I., MORRIS, R.F., 1973

Bact. Rev., 37, 136-165

Biology of Bifidobacteria

RASIC, J.L., KURMANN, J.A., 1983

In "Fermented fresh milk products and their culture ", Vol.2 :
Bifidobacteria and their rôle. Microbiological, nutritionnal,
physiological, medical and technological aspects and bibliography, Ed
Birkhauser, Basel, Boston, Stuttgart

RAYNAUD, M., 1959

Ann. Paed., 35, 8-23

Le facteur bifidus 2.

RAYHAUD, M., BIZZINI, B., 1971

Ann. Nutrit. Aliment., 25, 209-223

Purification et propriétés du facteur bifidus 2

REUTER, G., 1963

Zbl. Bakt., 191 (4), 486-507

Untersuchungen über die Bifidus Flora im Säuglings- und Erwachsenenstuhl

ROBERTS, A.K., HARZER, B.S., DRASAR, B.S., HILL, M.J., 1984

Microecology Therapy, 14, 307

The effect of diet on bacterial flora of infant gut

ROMOND, C., BEERENS, H., NEUT, C., MONTREUIL, J., 1980

Ann. Microbiol. Inst. Pasteur, 131, 309-314

Contribution à l'étude de la maternisation des laits : influence in vitro du lait maternel, du lait de Vache et de laits maternisés sur la croissance de *Bifidobacterium*

ROSE, C.S., GYORGY, P., 1963

Proc. Soc. Exp. Biol., 112, 923-926

Bifidus factor 2 for growth of *Lactobacillus bifidus*

ROSE, C.S., KUHN, K., ZILLIKEN, F., GYORGY, P., 1954

Arch. Biochem. Biophys., 49, 123-129

The activity of alpha and beta methyl N-acetyl-glucosaminides

ROSS, C.A.C., DAVES, E.A., 1954

Lancet, 1, 994

Resistance of the breast-fed infant to gastroenteritis.

SAVAGE, D.C., 1977

In "Clarke & Bauchop", 277-310

Interaction between the host and its microbes

SCARDOVI, V., 1984

In "The prokariotes", Chapitre 19, 1951-1960

The genus *Bifidobacterium*

SCARDOVI, V., 1986

In "Bergey's manual of determinative bacteriology, IX th Ed

SCARDOVI, V., CASOLICCHIO, F. VINCENZI, M., 1979

Int. J. Syst. Bact., 29 (4), 312-327

Multiple electrophoretic form of transaldolase and 6-phosphogluconic dehydrogenase and their relationships to the taxonomic and ecology of the Bifidobacteria

SCARDOVI, V., SGORBATI, B., 1974

J. Microbiol. Serol., 40 (3), 427-440

Electrophoretic types of transaldolase, transketolase and other enzymes in *Bifidobacteria*

SCARDOVI, V., SGORBATI, B., ZANI, G., 1971

J; Bact., 106, 1036-1039

Starch gel electrophoresis of fructose-6-phosphate phosphoketolase in the genus *Bifidobacterium*

SCARDOVI, V., TROVATELLI, L.D., 1965

Ann. Microbiol. Enzymol., 15, 19-29

The fructose-6-phosphate shunt as a peculiar pattern of hexaose degradation in the genus *Bifidobacterium*

SCARDOVI, V., TROVATELLI, L.D., 1969

Zbl. Bakt., 123, 64-88

New species of bifid bacteria from *apis mellifica* L. and *apis indica* F. A contribution to the taxonomy and biochemistry of the genus *Bifidobacterium*

SCARDOVI, V., TROVATELLI, L.D., 1974

Int. J. Syst. Bact., 24, 21-28

Bifidobacterium animalis comb. nov. and the "minimum" and "subtile" groups of new *Bifidobacteria* found in sevrage

SCARDOVI, V., TROVATELLI, L.D., CROCIANI, F., SGORBATI, B., 1969

Arch. Mikrobiol., 68, 278-294

Bifid bacteria in bovine rumen

SCARDOVI, V., TROVATELLI, L.D., ZANI, G., CROCIANI, F., MATTEUZZI, D., 1971

Int. J. Syst. Bact., 21, 276-294

Desoxyribonucleic acid homology relationships among species of the genus *Bifidobacterium*

SHEARD, N.F., WALKER, W.A., 1988

Nutrition Reviews, 46 (1), 1-7

The role of breast milk in the developpement of the gastrointestinal tract.

SCHÖNFELD, H., 1926

Jb. Kinderheilk, 113, 19

über die Beziehungen der einzelnen Bestandteile der Frauenmilch zur *Bifidus*flora.

SEKA ASSY, N., 1982

Thèse de 3^e cycle de l'université de Lille I

Contribution à l'étude des facteurs bifidigènes présents dans le lait maternel

SGORBATI, B., LEVAZ, G., CASALICHIO, F., 1976

J. Microbiol. Serol., 42, 49-57

Purification and properties of two fructose-6-phosphate phosphoketolase in *Bifidobacterium*

SGORBATI, B., SCARDOVI, V., LEBLANC, D.J., 1982

J. Gen. Microbiol., 128, 2121-2131

Plasmids in the genus *Bifidobacterium*

SGORBATI, B., SCARDOVI, V., LEBLANC, D.J., 1986

Microbiol., 2, 415-422

Related structures in the plasmid profiles of *B. Longum*

SITTLER, P., 1908

Zbl. Bakt., 47, 14-30

Beiträge zur Bakteriologie des Säuglingsdarmes.

STACKEBRANDT, E., WOESE, C.R., 1981

Cur. Microbiol., 5, 197-202

Toward a phylogeny of the Actinomycetes and related organisms

STARK, P.L., LEE, A., 1982

J. Hyg., 89 (1), 59-67

The bacterial colonization of large bowel of preterm low birth weight neonates

STEVENSON, D.K., YANG, C., KERNER, J.A., YAGER, A.S., 1985

Clin. Pediatr., 24 (6), 338-341

Intestinal flora in the second week of life in hospitalized preterm infants fed stored frozen breast milk or a proprietary formula

TANAKA, R., TAKAYAMA, H., MOROVOMI, M., KUROSHINA, T., UYAMA, S.,

MATSUMOTO, K., KURODA, A., NATAI, M., 1983

Bifidobacteria Microflora, 2, 17-24

Effect of administration of TOS and *Bifidobacterium breve* 4006 on the human fecal flora

TISSIER, H., 1900

Thèse de l'université de Paris

Recherche sur la flore intestinale des nourrissons (état normal et pathologique)

TOMARELLI, R.M., NORRIS, R.F., ROSE, C.S., GYÖRGY, P., 1950

J. Biol. Chem., 187, 197-204

The effect of fatty acids on the growth of strains of *Lactobacillus bifidus*.

TOMARELLI, R.M., HASSINEN, J.B., ECKARDT, E.R., CLARK, R.H., BERNHART, F.M., 1954

Arch. Biochem. Biophys., 48, 225-232

The isolation of a crystalline growth factor for a strain of *L. bifidus*.

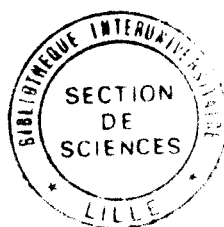
- TOPOUZIAN, N., BEZKOROVAINY, A., 1986**
I.R.C.S. Med. Sci., 14, 275-276
Iron uptake by *Bifidobacterium bifidum* var. *Pennsylvanicus*. The effect
sulfhydryl reagents and metal chelators
- TOUZEL, J.P., ALBAGNAC, J., 1983**
FEMS Microbiol. Lett., 16, 241-245
Isolation and characterisation of *Methanococcus mazei* strain MC 3.
- UEDA, M., NOKAMOTO, S., NAKAR, R., TAGAGI, A., 1983**
J. Gen. Appl. Microbiol., 29, 103-114
Establishment of a defined minimal medium and isolation of auxotrophic
mutants for *B. bifidum* ES5
- VEERKAMP, J.H., 1969**
Arch. Biochem. Biophys., 129, 245-256
Uptake and metabolism of derivatives of 2 deoxy 2 amino D glucose in
Bifidobacterium bifidum var. *Pennsylvanicus*
- VEERKAMP, J.H., 1969**
Arch. Biochem. Biophys., 129, 257-263
Catabolism of glucose and derivatives of 2 deoxy α amino glucose in
Bifidobacterium bifidum Var. *Pennsylvanicus*
- VEERKAMP, J.H., HOLEN, G.E.J.M., HOPE DEAN CAMP, H.J.M., 1983**
Biochem. Biophys. Acta, 755, 439-451
- VEERKAMP, J.H., LAMBERT, R., SAITO, Y., 1965**
Arch. Biochem. Biophys., 112 (1), 120-125
The composition of the cell wall of *Lactobacillus bifidus* var.
Pennsylvanicus
- WARREN, L., 1959**
J. Biol. Chem., 234, 1971-1975
The thiobarbituric acid assay of sialic acids
- WEBER, K., OSBORN, M., 1969**
J. Biol. Chem., 224, 4406-4412
The reliability of molecular weight determinatio by dodecyl sulfate
polyacrylamid gel electrophoresis
- WEISS, J.E., RETTGER, L.F., 1934**
J. Bact., 27, 39-40
Lactobacillus bifidus TISSIER and its biological position in the group of
aciduric organism
- WEISS, J.E., RETTGER, L.F., 1938**
J. Bact., 35, 17-18
Taxonomic relationship of *Lactobacillus bifidus* and *Bacteroides bifidus*

- YAMASHITA, M., SUSAKI, M., HAMADA, K., UENO, H., 1976**
Nogei Kagakukai Zasshu, 50, 481-487
Studies on growth promoting substances for *L. bifidus* found in cultured medium of *E. Coli*
- YOSHIOKA, Y., 1971**
Rep. Res. Lab., snow Brand Milk, Prod. Co. Tokyo, 72, 1-114
Studies on *Lactobacillus bifidus* on the factor affecting the formation of bifidus flora in the intestinal tracts of infants
- YOSHIOKA, Y., 1971**
Rep. Res. Lab., Snow Brand Milk, Prod. Co. Ltd., 12, 359-402
Studies on *Lactobacillus bifidus*.
- YOSHIOKA, Y., FUJITA, K., ISEKI, K., 1984**
Pediatrics, 74 (4), 563
Bacterial flora of breast-fed infants
- YOSHIOKA, Y., ISEKI, K., FUJITA, K., 1983**
Pediatrics, 72 (3), 317-321
Development and differences of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants
- YOSHIOKA, Y., YOSHIOKA, S., TAMURA, Z., OHTA, T., 1968**
Jpn. J. Microbiol, 12, 395-402
Growth responses of *Bifidobacterium bifidum* to coenzym A : its precursors and carrot extract
- YUHARA, T., ISOKIMA, S., TSUCHIYA, F., MITSUOKA, T., 1983**
Bifidobacteria Microflora, 2 (1), 33-39
On the intestinal flora of bottle-fed infant
- ZANI, G., SEVERI, A., 1982**
Microbiol., 5, 255-267
Cellular ultrastructure and morphology in *B. bifidum*
- ZRIKUS, J.G., HENNING, D.L., 1975**
Anatomie van Leeuwenhoek, 41, 543-552.
Methanobacterium arbophilicum Sp nov an obligate anaerobe isolated from wetwood of living trees.
- ZILLIKEN, F., SMITH, P.M., TOMARELLI, R.M., GYORGY, P., 1955**
Arch. Biochem. Biophys., 54, 598-405
4-O-beta-D-galactopyranosyl-N-acetyl-D-glucosamine in hog mucine
- ZILLIKEN, F., SMITH, P.M., ROSE, C.S., GYORGY, P., 1955**
J. Biol. Chem., 217, 79-82
Synthesis of 4-O-beta-D-galactopyranosyl-N-acetyl-glucosamine by intact cells of *Lactobacillus var. Penn*

ZILLIKEN, F., ROSE, C.S., BRAUN, G.A., GYORGY, P., 1955

Arch. Biochem. Biophys., 54, 392-397

Preparation of alkyl N-acetyl alpha and beta D-glucosaminides and their
microbiological activity for *Lactobacillus bifidus* var *Penn.*



RESUME

La production de beta-D-galactosidase (EC.3.2.1.23), de N-acétyl-beta-D-glucosaminidase (EC.3.2.1.30), de neuraminidase (EC.3.2.1.18) et d'alpha-L-fucosidase (EC.3.2.1.51) a été optimisée par fermentation. La bactérie anaérobie Bifidobacterium bifidum souche AA/22 a été cultivée en milieu liquide renfermant par litre : 37 g d'un extrait sec de cerveau-coeur, 10 g de glucose et des facteurs bifidogènes (1 g de gynolactose ou 66 ml de lait de femme). La fermentation est conduite sous N_2/CO_2 à 37°C et à pH 6,8.

L'extraction des systèmes enzymatiques par une technique aux ultra-sons a été optimisée en tampon phosphate de sodium 20 mM pH 6,8 renfermant de l'EDTA 20 mM et 0,1 p.100 de nonidet P 40. Après centrifugation d'une heure à 100 000 g la solution enzymatique obtenue renferme : 7 U de beta-D-galactosidase, 1,6 U de N-acétyl-beta-D-glucosaminidase, 90 mU de neuraminidase et 400 mU de fucosidase par mg de protéine.

Une neuraminidase a été purifiée jusqu'à homogénéité en électrophorèse dénaturante (SDS). La masse moléculaire de l'enzyme native est de 75 kDa, elle est constituée par deux sous-unités identiques (35 kDa). Le pI, la température et le pH optimum d'action sont respectivement de 4,2, 50°C et 5,0. Cette neuraminidase est sensible à l'action de la température, elle n'est stable qu'en dessous de 48°C. L'activité est indépendante des métaux. Elle permet l'hydrolyse des liaisons alpha 2,3 plus rapidement que les alpha 2,6 et les alpha 2,8. L'enzyme agit aussi bien sur les glycopeptides que sur les glycoprotéines natives.

