

50376
1989
301

N° d'ordre : 427

50376
1989
301

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 : BIOCHIMIE

par

Laurence **APPOURCHAUX**



**PURIFICATION ET PROPRIETES DES
BETA-D-GALACTOSIDASES DES
N-ACETYL-BETA-D-GLUCOSAMINIDASES DE
BIFIDOBACTERIEUM BIFIDUM SOUCHE AA 2/2**



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).

A Eric,

A Maman,

qui n'ont pas eu la chance de voir s'achever cette thèse.

A Philippe et Claire,

Avec tout mon amour.

A Monsieur le Professeur BOUQUELET,

Je vous remercie de m'avoir accueillie dans votre équipe de recherche. Au cours de ces années de travail, votre expérience, l'ambiance chaleureuse et la bonne humeur que vous faites régner m'ont permis de mener à bien mes travaux. Je vous en suis reconnaissante. Soyez assuré de mon amitié.

A Monsieur le professeur MONTREUIL,

Vous m'avez fait l'honneur de bien vouloir m'accepter dans votre laboratoire. Je voudrais vous exprimer ma plus vive gratitude pour la confiance que vous m'avez témoignée et pour la formation que j'ai pu acquérir. Malgré vos nombreuses occupations, vous m'avez fait l'honneur de présider le jury de cette thèse. Soyez assuré de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur ROMOND,

Je vous remercie vivement de m'avoir fourni la souche de *Bifidobacterium bifidum*, élément essentiel de ce travail. Vous m'avez fait l'honneur d'être le rapporteur de cette thèse. Soyez assuré de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

A Monsieur le Docteur DUBOURGUIER,

Vous avez accepté avec beaucoup d'amabilité de juger ce travail, en prenant la responsabilité d'être rapporteur. Je vous en suis très reconnaissante et je tiens à vous exprimer mes plus vifs remerciements.

A Madame SPIK,

Vous avez bien voulu me faire l'honneur de juger cette thèse. Je vous prie de bien vouloir trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Je remercie tous ceux qui par leur collaboration, leur aide et leur amitié m'ont aidée au cours de ces six années passées au C 9.

ABBREVIATIONS

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 |
| FACTEURS BIFIDIGENES | |
| I-MODIFICATION DE LA COMPOSITION DU LAIT DE VACHE | |
| <u>A-GENERALITES</u> | |
| <u>B-LE LACTOSE ET SES DERIVES</u> | p. 4 |
| <u>C-AUTRES CONSTITUANTS</u> | |
| 1-LES PROTEINES ET LES SELS | |
| 2-LES ACIDES GRAS | p. 5 |
| II-IDENTIFICATION DE FACTEURS BIFIDIGENES | |
| <u>A-DEFINITION</u> | |
| <u>B-LE LACTULOSE</u> | p. 6 |
| <u>C-LE BIFIDUS FACTEUR 1 DE GYORGY</u> | p. 7 |
| 1-NISE EN EVIDENCE | |
| a-Découverte d'un mutant | |
| b-Les oligosaccharides du lait de Femme | |
| 2-RELATION STRUCTURE-ACTIVITE | p. 8 |
| <u>D-LE FACTEUR DE RAYNAUD</u> | p. 14 |
| <u>R-CONSTITUANTS DIVERS</u> | p. 15 |
| 1-GLYCOPROTEINES ET GLYCOPEPTIDES | |
| 2-PANTETHEINE ET JUS DE CAROTTE | p. 17 |
| 3-OLIGOSACCHARIDES ET GLYCOPROTEINES PRODUITS PAR D'AUTRES BACTERIES | |
| III-CONCLUSIONS | p. 18 |
| BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM | |
| I-BIOLOGIE DE BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM | p. 19 |
| <u>A-INTRODUCTION</u> | |

| | |
|--|-------|
| <u>B-CARACTERISTIQUES DU GENRE BIFIDOBACTERIUM</u> | p. 20 |
| 1-MORPHOLOGIE | |
| a-Historique | |
| b-Pléomorphisme et forme bifide | |
| c-Ultrastructure | p. 22 |
| 2-CARACTERISTIQUES PHYSIOLOGIQUES | p. 23 |
| a-Anaérobiose | |
| b-Température et pH | p. 24 |
| 3-BESOINS NUTRITIONNELS | |
| a-Nutrition azotée | |
| b-Nutrition minérale | |
| c-Besoins vitaminiques | p. 25 |
| d-Facteurs bifidigènes | |
| 4-METABOLISME DES SUCRES | |
| a-Introduction | |
| b-Le shunt de la fructose-6-phosphate-cétolase | p. 26 |
| c-Décarboxylation du pyruvate | p. 28 |
| d-Formation de l'acétate et de l'éthanol | |
| e-Conclusion | |
| 5-CONCLUSIONS | p. 30 |
| <u>C-DETERMINATION DE L'ESPECE</u> | |
| 1-INTRODUCTION | |
| 2-DEGRADATION DES SUCRES | p. 31 |
| 3-HYBRIDATION ADN ADN | |
| 4-CARACTERISATION DES PROTEINES | p. 32 |
| 5-COMPOSITION DE LA PAROI | p. 34 |
| 6-CONCLUSIONS | |
| | |
| II-ECOLOGIE DE BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM | p. 37 |
| | |
| <u>A-INTRODUCTION</u> | |
| <u>B-GENERALITES</u> | |
| <u>C-IMPLANTATION CHEZ L'HOMME</u> | p. 39 |
| 1-ETABLISSEMENT DE LA FLORE BIFIDE CHEZ LE NOUVEAU-NE | |
| a-Mode de naissance | |
| b-Alimentation | p. 40 |
| c-Individualité et environnement | |
| 2-EVOLUTION CHEZ L'HOMME | p. 42 |
| 3-ROLE DE LA FLORE BIFIDE | |

MATERIEL ET METHODES p. 45

I-TECHNIQUE DE CULTURE

A-MILIEU DE CULTURE

B-PRODUCTION DE BIOMASSE

II-TECHNIQUES D' EXTRACTION p. 46

III-MESURES DES ACTIVITES GLYCOSIDASIQUES p. 47

**A-MISE EN EVIDENCE DES ACTIVITES β -D-GALACTOSIDASIQUE ET
 β -ACETYL- β -D-HEXOSAMINIDASIQUE**

1-PRINCIPE

2-MODE OPERATOIRE

B-MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE α -D-NEURAMINIDASIQUE p. 48

1-PRINCIPE

2-MODE OPERATOIRE

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

1-PRINCIPE

2-MODE OPERATOIRE p. 49

IV-DOSAGE DES PROTEINES

V-TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES

A-CHROMATOGRAPHIE SUR HYDROXYLAPATITE ULTROGEL

B-CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D' IONS SUR MONO Q p. 50

C-CHROMATOGRAPHIE HYDROPHOBE SUR OCTYL SEPHAROSE

VI-ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE p. 51

A-ELECTROPHORESE EN CONDITIONS DENATURANTES

B-ELECTROPHORESE EN CONDITIONS NON DENATURANTES

**C-TRANSFERT DES PROTEINES ET REVELATION DES PROTEINES APRES
TRANSFERT**

VII-ETUDE DES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES p. 52

| | |
|--|-------|
| <u>A-DETERMINATION DES MASSES MOLECULAIRES PAR CHROMATOGRAPHIE DE TAMISAGE MOLECULAIRE</u> | |
| <u>B-DETERMINATION DU POINT ISOELECTRIQUE PAR CHROMATOFOCALISATION</u> | p. 53 |

VIII-ETUDE DES PROPRIETES ENZYMATIQUES

| | |
|---|-------|
| <u>A-DETERMINATION DES PH OPTIMAUX</u> | |
| 1-SOLUTION STOCK DE TAMPON CITRATE BORATE | |
| 2-TAMPON CITRATE PHOSPHATE BORATE 0,1 M | |
| <u>B-DETERMINATION DES TEMPERATURES OPTIMALES</u> | p. 54 |
| <u>C-DETERMINATION DES K_m ET DES V_{max}</u> | |
| 1-ACTIVITES β -D-GALACTOSIDASIQUES | |
| a-Détermination sur le pNP-Gal | |
| b-Détermination sur le lactose | |
| c>Action des β -D-galactosidases sur différents substrats | p. 55 |
| 2-ACTIVITES N-ACETYL- β -D-GLUCOSAMINIDASIQUES | |
| 3-ACTIVITE α -D-NEURAMINIDASIQUE | |

| | |
|--|------|
| IX-ACTIONS D'EFFECTEURS SUR LES DIFFERENTES ACTIVITES | p.56 |
|--|------|

X-ACTION DE LA FRACTION MONO Q 0,375 M SUR UN MELANGE DE SUBSTRATS

| | |
|---|-------|
| 1-ACTION SUR UN MELANGE DE SUBSTRATS SYNTHETIQUES | |
| 2-ACTION SUR LE pNP-GlcNAc EN PRESENCE DE GALACTOSE OU DE N-ACETYL-GLUCOSAMINE | p. 57 |
| 3-ACTION SUR LE pNP-Gal EN PRESENCE DE GALACTOSE OU DE N-ACETYL-GLUCOSAMINE | |
| 4-ACTION SUR LE pNP-Gal ou le pNP-GlcNAc EN PRESENCE DE PARANITROPHENOL | |

RESULTATS

| | |
|--|-------|
| I-PRODUCTION DE <i>BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM</i> | p. 58 |
| II-EXTRACTION DES ACTIVITES GLYCOSIDASIQUES | |
| III-PURIFICATION DES ACTIVITES GLYCOSIDASIQUES | p. 60 |

A-PURIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE SUR HYDROXYLAPATITE-ULTROGEL

1-LAVAGE PIC I

2-FRACTION F_I p. 64

3-FRACTION F_{II}

4-FRACTION F_{III}

5-CONCLUSION p. 65

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

1-ETUDE DE LA FRACTION F_{II} p. 67

a-Mode opératoire

b-Résultats

c-Conclusions p. 71

2-ETUDE DE LA FRACTION F_{III}

C-CHROMATOGRAPHIE D'INTERACTION HYDROPHOBE SUR OCTYL-SEPHAROSE p. 73

1-ETUDE DE LA FRACTION F_{II} MONO Q 0,1 M

2-ETUDE DE LA FRACTION F_{II} MONO Q 0,25 M

3-ETUDE DE LA FRACTION F_{II} MONO Q 0,375 M p. 76

4-ETUDE DE LA FRACTION F_{II} 0,6 M

5-ETUDE DE LA FRACTION F_{III}

6-CONCLUSION

D CONCLUSIONS

IV-ETUDE PAR ELECTROPHORESE EN CONDITIONS DENATURANTES

ET NON DENATURANTES DES DIFFERENTES FRACTIONS p. 82

A-SUIVI DE LA PURIFICATION PAR ELECTROPHORESE EN CONDITIONS DENATURANTES

B-REVELATIONS DES ACTIVITES APRES MIGRATION ELECTROPHORETIQUE

EN CONDITIONS NON DENATURANTES p. 88

C-CONCLUSIONS

V-DETERMINATION DES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES p. 93

A-DETERMINATION DES MASSES MOLECULAIRES

1-RESULTATS

2-CONCLUSIONS

B-DETERMINITION DES POINTS ISOELECTRIQUES p. 95

1-RESULTATS

2-CONCLUSIONS

VI-DETERMINATION DES PARAMETRES ENZYMATIQUES

p. 98

A-DETERMINATION DES pH OPTIMAUX

1-DETERMINATION DES pH OPTIMAUX DES ACTIVITES

β-D-GALACTOSIDASIQUES

2-DETERMINATION DES pH OPTIMAUX DES ACTIVITES

N-ACETYL-β-D-HEXOSAMINIDASIQUES

3-DETERMINATION DU pH OPTIMAL DE L'ACTIVITE

α-D-NEURAMINIDASIQUE

4-DETERMINATION DU pH OPTIMAL DE L'ACTIVITE

α-L-FUCOSIDASIQUE

B-DETERMINATION DES TEMPERATURES OPTIMALES

p. 99

1-DETERMINATION DES TEMPERATURES OPTIMALES DES ACTIVITES

β-D-GALACTOSIDASIQUES

2-DETERMINATION DES TEMPERATURES OPTIMALES DES ACTIVITES

N-ACETYL-β-D-HEXOSAMINIDASIQUES

3-DETERMINATION DE LA TEMPERATURE OPTIMALE DE L'ACTIVITE

α-D-NEURAMINIDASIQUE

4-DETERMINATION DE LA TEMPERATURE OPTIMALE DE L'ACTIVITE

α-L-FUCOSIDASIQUE

**C-DETERMINATION DES PARAMETRES ENZYMATIQUES K_m ET V_m DES
ACTIVITES EXOGLYCOSIDASIQUES**

P. 101

1-DETERMINATION DES PARAMETRES ENZYMATIQUES DES ACTIVITES

β-D-GALACTOSIDASIQUES

a-Détermination des paramètres enzymatiques sur le pNP-gal
et le lactose

b>Action des activités β-D-galactosidasiques sur différents
substrats

2-DETERMINATION DES PARAMETRES ENZYMATIQUES DES ACTIVITES

N-ACETYL-β-D-HEXOSAMINIDASIQUES

p. 103

3-DETERMINATION DES PARAMETRES ENZYMATIQUES DE L'ACTIVITE

α-D-NEURAMINIDASIQUE

4-DETERMINATION DES PARAMETRES ENZYMATIQUES DE L'ACTIVITE

α-L-FUCOSIDASIQUE

p. 104

**D-ACTION DE DIFFERENTS EFFECTEURS SUR LES ACTIVITES
EXOGLYCOSIDASIQUES ETUDIEES**

**E-ACTION DE LA FRACTION $E_{1.1}$ MONO Q O,375 M SUR DEUX TYPES
DE SUBSTRATS**

P. 107

F-CONCLUSIONS

P. 109

CONCLUSION GENERALE

p. 112

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

On sait depuis les études de TISSIER (1900) que la flore intestinale du nourrisson alimenté au sein est caractérisée par la présence en proportion prépondérante d'une bactérie anaérobie particulière : *Bifidobacterium bifidum*. Par ailleurs, chez les enfants nourris au lait de Femme, les taux de mortalité et de morbidité sont plus faibles que chez l'enfant alimenté au lait de Vache. Ces deux observations rapprochées ont conduit de nombreux auteurs à admettre que la présence de la flore bifide dans l'intestin du nourrisson allaité, était la cause directe de leur état de résistance accrue. Les Bifidobactéries pourraient exercer une répression de la flore "putréfiante" et s'opposer à la prolifération des germes pathogènes exogènes. Cet effet du microorganisme s'ajoute à la protection obtenue par des substances contenues dans le lait de Femme, en particulier le lysozyme, la lactotransferrine et les immunoglobulines.

La maternisation des laits industriels en vue de la protection de l'intestin du nourrisson est l'une des préoccupations majeures du Laboratoire. Ces études concernent deux axes privilégiés :

- 1° L'étude de la lactotransferrine
- 2° L'étude de facteurs spécifiques appelés : facteurs bifidigènes. Ceux-ci sont de nature complexe et différent selon les espèces de Bifidobactéries; dans le cas du lait de Femme, il peut s'agir d'oligosaccharides contenus dans le gynolactose.

Il a été démontré, bien que ceci soit encore très controversé (POCH et BEZKOROVAINY, 1988), que ces oligosaccharides possèdent une activité bifidigène car ils renferment un monosaccharide indispensable à la synthèse du peptidoglycane : la N-acétyl-D-glucosamine. Celle-ci n'est jamais en position externe et nécessite pour sa libération un équipement en exoglycosidases capables de dégrader totalement les oligosaccharides. Nous sommes partis de cette constatation et nous avons tenté de répondre à la question suivante : *Bifidobacterium bifidum* possède t-il un équipement enzymatique suffisant pour pouvoir libérer ce type de monosaccharide ?

Avant d'entreprendre l'étude des différents systèmes glycosidiques de dégradation, où nous nous limiterons aux activités suivantes : β -D-galactosidase, N-acétyl- β -D-hexosaminidase, α -L-fucosidase et α -D-neuraminidase, il nous a paru nécessaire de définir les différentes espèces de Bifidobactéries ainsi que de définir les différents facteurs bifidigènes.

GENERALITES

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 la 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-LBS 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 fèces (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).

Cependant la forte teneur en acides gras essentiels (linoléique, linoléique) 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

a-Découverte d'un mutant

GYORGY *et al.* (1954) découvrent un mutant, le *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 colostrum 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 simultanément par KHÜN et par MONTREVIL ont permis de conclure que le gynolactose est un mélange très complexe de nombreux oligosaccharides. A ce jour, plus de 60 structures ont été mises en évidence. Elles sont rassemblées dans la revue générale de KOBATA (1977). L'importance de ces sucres nous a amené à faire un bref rappel de leurs structures.

b-Les oligosaccharides du lait de Femme

Les oligosaccharides sont classés en deux groupes : les oligosaccharides neutres et les oligosaccharides acides.

- Les oligosaccharides neutres :

La structure de ces oligosaccharides a été déterminée grâce aux recherches de KÜHN, MONTREUIL, GRIMMONPREZ et MONTREUIL et KOBATA *et al.* On distingue les oligosaccharides neutres non azotés et les oligosaccharides neutres azotés suivant qu'ils contiennent ou non de la N-acétylglucosamine. Certaines de ces structures sont reportées dans le tableau I page 9. On remarque que tous ces sucres possèdent dans leur molécule du lactose en position terminale réductrice. De plus, pour les oligosaccharides azotés, on constate que le reste de la molécule est formé soit d'une unité de N-acétyllactosamine, soit de la N-acétylisolactosamine, soit la répétition de ces deux oligosaccharides.

- Les oligosaccharides acides :

La présence d'acide sialique dans le lait de Femme a été démontrée par HOOVER *et al.* en 1953 et par ZILLIKEN *et al.* en 1956. Ils l'appelèrent acide gynaminique. Par la suite, KÜHN et BROSSMAN (1956) l'ont identifié à l'acide N-acétylneuraminique. Ces résultats ont conduit à l'isolement de nombreux sialosides du lait maternel. KÜHN (1958, 1959) a isolé du lait de Femme deux formes combinées de l'acide N-acétylneuraminique et du lactose : le 3' et le 6' lactaminyllactose, puis trois oligosaccharides dont la structure a été déterminée en 1965 (KÜHN et GAUHE). Les études poursuivies au laboratoire par GRIMMONPREZ et MONTREUIL (1968) ont permis d'isoler six nouveaux oligosaccharides dont les unités structurales sont constituées de lacto-N-tétraose ou de lacto-N-néotétraose. Les structures caractéristiques de ces sucres acides figurent dans le tableau II page 10.

Seuls les oligosaccharides contenant de la N-acétylglucosamine ont une activité bifidigène. 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

**TABLEAU I : STRUCTURES CARACTERISTIQUES D'OLIGOSACCHARIDES NEUTRES DU
LAIT HUMAIN**

(MONTREUIL, 1956, GRIMMONPREZ et MONTREUIL, 1968, KHÛN et
BAER, 1956, KHÛN et GAUHE, 1962)

OLIGOSACCHARIDES NEUTRES DEPOURVUS D'AZOTE

| | |
|---------------------|---|
| 2' Fucosido-lactose | Gal(β 1-4)Glc Fuc(α 1-2) |
| 3 Fucosido-lactose | Gal(β 1-4)Glc Fuc(α 1-3) |
| Lactodifucotétraose | Gal(β 1-4)Glc Fuc(α 1-2)Fuc(α 1-3) |

OLIGOSACCHARIDES NEUTRES AZOTES

| | |
|-------------------------|---|
| Lacto-N-tétraose | Gal(β 1-3)GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)Glc |
| Lacto-N-néotétraose | Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)Glc |
| Lacto-N-fucopentaose I | Gal(β 1-3)GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)Glc Fuc(α 1-2) |
| Lacto-N-fucopentaose II | Gal(β 1-3)GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)Glc Fuc(α 1-4) |
| Lacto-N-difucohexaose | Gal(β 1-3)GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)Glc Fuc(α 1-2) Fuc(α 1-4) |

**TABLEAU II : STRUCTURES CARACTERISTIQUES D'OLIGOSACCHARIDES ACIDES DU
LAIT DE FEMME**

(KÜHN, 1958, 1959, KÜHN et GAUHE, 1965, GRIMMONPREZ et
MONTREUIL, 1968)

| | |
|---------------------------|--|
| 3' Sialyl lactose | NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-4)Glc |
| 6' Sialyl lactose | NeuAc(α 2-6)Gal(β 1-4)Glc |
| Sialyl lacto-N-tétraose A | NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-3)GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)Glc |
| Sialyl lacto-N-tétraose B | Gal(β 1-3)GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)Glc NeuAc(α 2-6) |
| Sialyl lacto-N-tétraose C | NeuAc(α 2-6)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)Glc |
| Disialyl lacto-N-tétraose | NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-3)GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)Glc NeuAc(α 2-6) |

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 III; p. 12). Ils ont une activité comparable à celle de la N-acétyllactosamine (GYORGY et ROSE, 1955). Les N-acyls 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 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*

TABLEAU III : 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.

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 IV; p. 14). 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).

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

TABLEAU IV : 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 | | (-) |

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 V page 16 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 promotionnelle 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.

**TABLEAU V : 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 papaïnique 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.

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- PANTETHINE 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 pantéthine 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.

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.

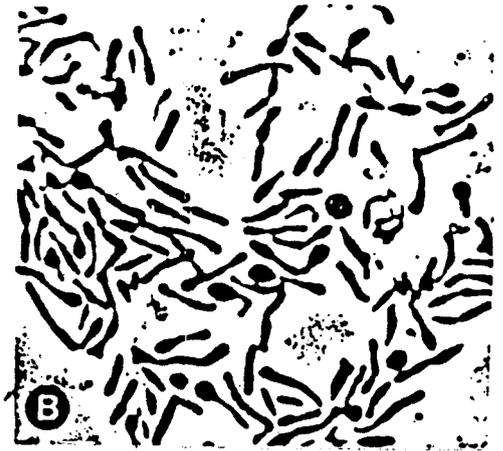
Seule l'utilisation de milieux sélectifs, dont le premier fut celui de NORRIS *et al.* (1950), a permis une étude systématique de la morphologie. Une comparaison des formes des différentes espèces cultivées en milieu anaérobie dans un milieu trypticase - peptone - extrait de levure (TPY) montre que certaines espèces ont des formes caractéristiques qui peuvent éventuellement être utilisées comme critère de classification (Figure 1; p.21).

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



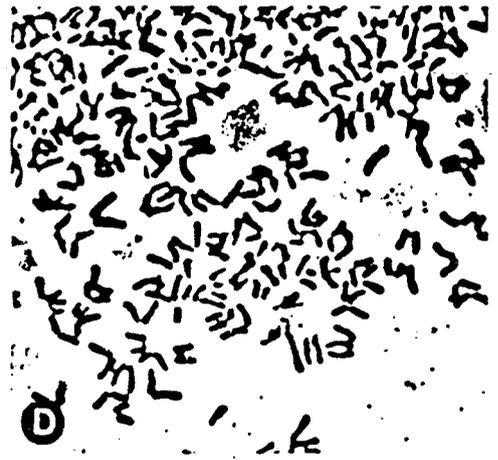
B. bifidum



B. longum



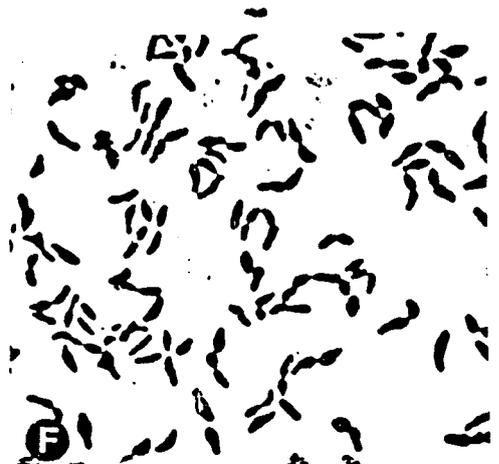
B. breve



B. angulatum



B. catenulatum



B. globosum

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

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 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 FOUFARD 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 a justifié d'une étude détaillée antérieure, 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 (laits, 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.27) 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'EMDEN 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.

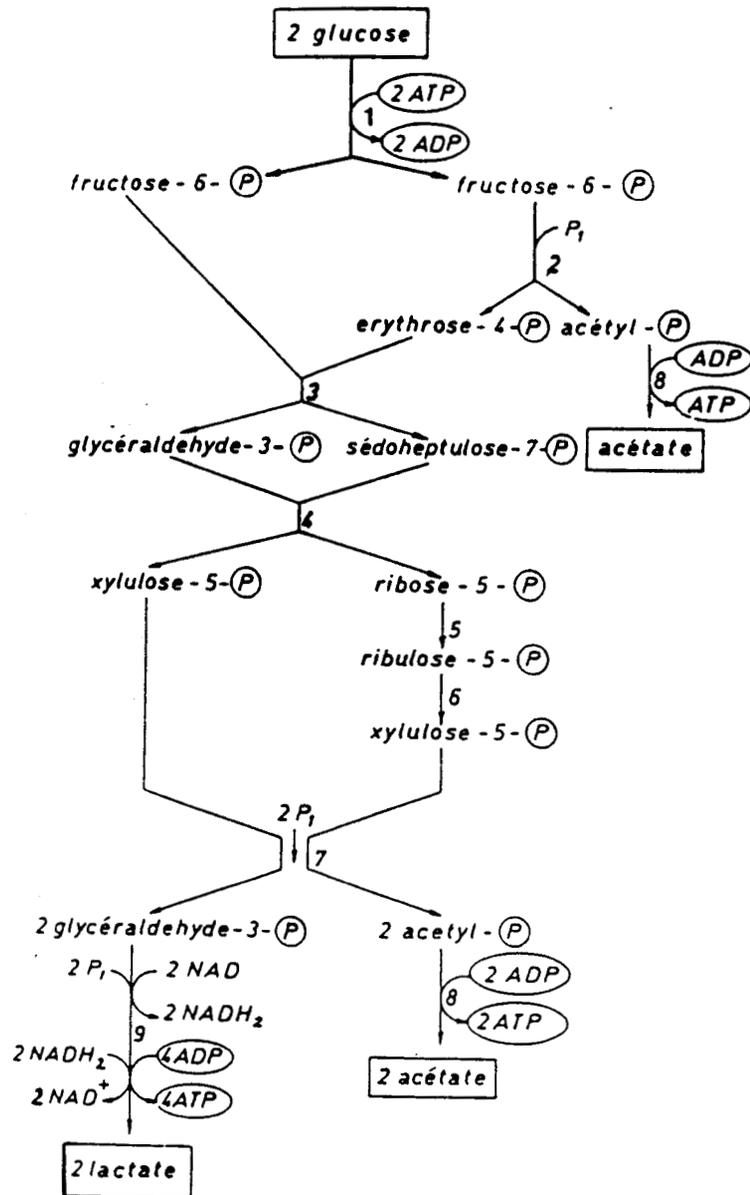


FIGURE 2: DEGRADATION DES HEXOSES PAR LA VOIE DU FRUCTOSE-6-PHOSPHATE PHOSPHOCÉTOLEASE

- 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-épipimérase
 7 : xylulose-5-phosphate phosphocétolase
 8 : acétate kinase
 9 : enzymes de la voie homofermentaire

c-Decarboxylation du pyruvate :

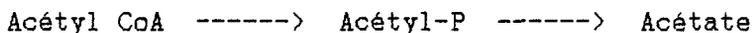
On rencontre en anaérobiose trois types de réaction de transformation du pyruvate en acétyl-Co A : la réaction phosphoclastique, la réaction thioclastique et la voie de la pyruvate décarboxylase.

La réaction thioclastique chez les Bifidobactéries est catalysée 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 VI; p.29) 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).

**TABEAU VI : 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.

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 caractéristiques 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. 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 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. 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 les espèces (différenciées grâce à des critères génétiques) et les groupes (isolés phénotypiquement) (Figure 3; p. 33). 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*.

| 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).

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 peptidoglycane 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 glycocole, 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 VII; p. 35).

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 LAUER*, 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 VIII; p. 36).

TABEAU VII : COMPOSITION DE LA MUREINE CHEZ DIFFERENTES ESPECES DE BIFIDOBACRERIUM (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 VIII : PRINCIPALES CLASSIFICATIONS DU GENRE BIFIDOBACTERIUM
(POUPARD et al. 1973, SCARDOVI et al. 1986)

| EGERTH 1935 | DEHMERT 1957 | REUPER 1964 | MITSUOKA 1969 | SCARDOVI et al. 1971 | HOLDEMAN ET MOORE 1972 | SCARDOVI et al. 1986 |
|----------------|-----------------|-----------------------|------------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------|
| I | I - II | III a | bifidum a | bifidum | bifidum | bifidum |
| | | III b | bifidum b | infantis | infantis ss infantis | |
| | III | V | infantis a | infantis | infantis ss infantis | infantis ss infantis |
| | | | infantis b | infantis b | infantis ss lactensis | infantis ss lactensis |
| | | IX | liberorum | | infantis - other | |
| | | X | lactentis | | | |
| | | VII | breve a | breve | breve | breve |
| | | VIII | breve b | | | |
| | | | breve c | | | |
| | | IV | parvulorum a | | | |
| | VI | parvulorum b | | | | |
| II | V | I a | adolescentis a | adolescentis | adolescentis A | adolescentis |
| | | I b | adolescentis b | adolescentis | adolescentis B | |
| | I c | adolescentis c | adolescentis c | adolescentis C | | |
| | I d | adolescentis d | adolescentis d | adolescentis D | | |
| | | longum var longum a | longum | longum | longum | longum |
| | | longum var longum b | | | | |
| | | longum var animalis a | | | | animalis |
| | | longum var animalis b | | | | |
| | | pseudolongum a | pseudolongum | pseudolongum | pseudolongum | pseudolongum |
| | | pseudolongum b | | | | |
| | pseudolongum c | | | | | |
| | pseudolongum d | | | | | |
| | thermophilum a | thermophilum | thermophilum | thermophilum | thermophilum | |
| | thermophilum b | | | | | |
| | thermophilum c | | | | | |
| | thermophilum d | | | | | |
| | asteroides | asteroides | asteroides | asteroides | asteroides | |
| | suis | | | | | |
| | globosum | | | | | |
| | indicum | | | | | |
| | cornuiforme | | | | | |
| | minimam | minimam | minimam | minimam | minimam | |
| | subtile | subtile | subtile | subtile | subtile | |
| | pullorum | pullorum | pullorum | pullorum | pullorum | |
| | magnam | magnam | magnam | magnam | magnam | |
| | bovm | bovm | bovm | bovm | bovm | |
| | choericum | choericum | choericum | choericum | choericum | |
| | cuniculi | cuniculi | cuniculi | cuniculi | 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 IX;p. 38). 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'évolution chez l'Homme qui ont été étudiées ainsi que l'influence de la flore sur la santé.

TABLEAU IX : 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 $10,5 = 310^{10}$, $2,5 = 316$)

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-NE :

Avant la naissance, le foetus 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 (BEZIRTZOGLU, 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 (BEZIRTZOGLU, 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 X;p. 41); 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.

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

TABLEAU X : 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 fécès

après 65 ans, au profit des *Clostridium*, *Lactobacillus*, *E. coli* et *Streptococcus* (Tableau XI; p. 43). On note également une sélection des espèces en fonction de l'âge (Tableau XII; p. 44). 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 (BEZIRTZOGLU, 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.

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 bifidogènes devrait résoudre ce problème et il est donc nécessaire de faire le point des connaissances actuelles sur ce sujet.

TABEAU XI : 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 % |
| Bacteroïdes | 8,6 ± 1,7 | 41 | 10,4 ± 0,6 | 100 | 10,3 ± 0,6 | 100 | 10,0 ± 0,8 | 100 |
| Eurobactéries et lacto-bacilles 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 |
| Veillonellae | 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 XII : 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 |

MATERIEL ET METHODES

I-TECHNIQUE DE CULTURE

Le microorganisme utilisé lors de ce travail est le *Bifidobacterium bifidum* var b (AA 2/2). Il a été sélectionné par C. ROMOND (UER de Pharmacie de l'Université de Lille II) selon les critères de MITSUOKA (1974), et isolé à partir de fécès d'enfants nourris au sein.

A-MILIEU DE CULTURE

Le microorganisme est cultivé sur un milieu dont la composition est la suivante :

| | | |
|--|---|--------|
| - Oligoéléments + vitamines : | Extrait de levure | 5 g/l |
| - Source d'azote organique éléments nutritifs : | Bouillon cerveau-coeur (Institut Pasteur Production) | 37 g/l |
| - Source de carbone : | Glucose | 10 g/l |

Le milieu est réduit par une solution de chlorhydrate de cystéine à 0,5 g/l.

B-PRODUCTION DE BIOMASSE

300 ml de préculture sont réalisés en flacon durant 24 heures sans régulation de pH et son aspect est contrôlé au microscope. Elle permet d'inoculer un fermenteur de 6 litres SETRIC dont le milieu a été préalablement autoclavé pendant 3 heures à 120°C. Le glucose est stérilisé séparément et rajouté juste avant l'inoculation. La température de fermentation est de 37°C. Le pH est régulé à 6,0 par addition de soude 10 M. La fermentation est effectuée en anaérobiose sous mélange N₂/CO₂ (85/15). La propagation est arrêtée en phase exponentielle de croissance

(après 24 heures de fermentation). Elle permet d'ensemencer un fermenteur SETRIC de 200 litres. Les conditions de stérilisation et de culture sont identiques aux précédentes.

La croissance bactérienne est suivie par turbidimétrie au spectrophotomètre à 660 nm. La culture est arrêtée après 40 heures de fermentation, soit 10 heures après la fin de la phase exponentielle de croissance.

Après fermentation les cellules sont récupérées par centrifugation à 4°C à 7000 g et congelées à -80 °C dans un tampon phosphate de sodium 20 mM pH 7 contenant du glycérol à la concentration de 10 p.100.

II-TECHNIQUE D'EXTRACTION DES ACTIVITES EXOGLYCOSIDASIQUES

Le culot cellulaire est lavé dans un tampon phosphate de sodium 20 mM pH 6,8 contenant du NONIDET NP 40 et de l'EDTA aux concentrations respectives de 0,1 p.100 et 1 mM pour 30 g de matière sèche théorique par litre de tampon. La suspension cellulaire est introduite dans un tube en verre (2,7x10 cm). Une sonde à ultra-sons (diamètre 1,9 cm) est immergée dans la suspension. L'extraction est effectuée à -10°C afin que la température du milieu ne dépasse pas 2°C. Les paramètres du traitement aux ultra-sons sont les suivants :

- Type de l'appareil : BRANSON Sonifier Cell Disruptor B 30
- Fréquence : 20 Kcycles
- Amplitude : 20 microns pic à pic
- Durée du traitement : 30 minutes par périodes de 20 secondes par minute
- Durée effective : 10 minutes.

L'extrait obtenu après traitement aux ultra-sons est centrifugé à 100.000 g durant 2 heures à 4°C (Centrifugeuse BECKMAN LS 65 B, rotor 60 Ti). Les activités enzymatiques sont déterminées sur le surnageant obtenu après ultracentrifugation selon le protocole décrit page 47.

III-MESURES DES ACTIVITES GLYCOSIDASQUES

A-MISE EN EVIDENCE DES ACTIVITES β -D-GALACTOSIDASIQUE ET N-ACÉTYL- β -D-GLUCOSAMINIDASIQUE

Pour ces dosages nous utilisons des substrats synthétiques :

- le p-Nitrophényl- β -D-galactoside (pNP-Gal) (KOCH-LIGHT)
- le p-Nitrophényl-N-acétyl- β -D-glucosaminide (pNP-GlcNAc) (KOCH-LIGHT)

1-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.

2-MODE OPERATOIRE :

Il dérive de la méthode de GOMORI (1955).

Pour l'activité β -D-galactosidasique :

0,1 ml de pNP-Gal 10 mM sont mélangés avec
0,2 ml de tampon phosphate disodique 0,2 M pH 7 et
0,1 ml de fraction enzymatique.

Après incubation à 40 °C pendant 10 minutes 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.

Pour l'activité N-acétyl- β -D-glucosaminidasique :

0,1 ml de pNP-GlcNAc 5 mM sont mélangés avec
0,2 ml de tampon phosphate 0,2 M citrate 0,1 M pH 5,5 et
0,1 ml de fraction enzymatique.

L'incubation est réalisée à 45 °C et la réaction arrêtée selon le même protocole que précédemment.

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

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

1-PRINCIPE :

Pour ce dosage on utilise un substrat synthétique : le 2',4 méthylumbelliféryl-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).

2-MODE OPERATOIRE :

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.

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

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

1-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.

2-MODE OPERATOIRE :

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-DOSAGE DES PROTEINES

Au cours des étapes de chromatographie, les protéines sont repérées spectrophotométriquement à 280 nm. Pour la détermination des rendements chromatographiques et des activités spécifiques nous avons utilisé la méthode de BRADFORD (1976) qui utilise le Bleu de coomassie (BIORAD). La gamme étalon est réalisée avec de la serumalbumine bovine (SIGMA).

V-TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES

A-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'élution 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).

B-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 des différentes fractions obtenues sur Hydroxylapatite Ultrogel (maximum 15 mg de protéines par injection) et lavage de la colonne par le tampon d'équilibrage, on applique un gradient discontinu ou continu de NaCl de 0 à 1,5 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 les activités enzymatiques sont concentrées sur membrane AMICON PM 10 (seuil de coupure 10.000 daltons).

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

Les solutions enzymatiques sont équilibrées dans le tampon phosphate de sodium 5 mM pH 6,8 NaCl 2 M. Elles sont appliquées 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 400 ml. Les fractions recueillies sont de 3 ml. Les activités sont dosées sur chaque fraction. Les protéines sont repérées par mesure de la densité optique à 280 nm.

VI-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.

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 des masses moléculaires 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). Les proportions des différentes bandes protéiques sont mesurées au densitomètre BIORAD modèle 620.

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 les activités, on réalise un gel d'agarose (indubiose IBF) à 5 p.100 dans lequel on incorpore du méthylumbelliféryl-galactoside, du méthylumbelliféryl-N-acétyl- β -D-glucosaminide et du méthylumbelliféryl N-acétyl-neuramate à une concentration finale de 0,1 mM. Ces substrats sont dilués dans le tampon optimal des différentes activités. 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 ammoniac pendant 10 minutes. La présence des activités 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 des activités enzymatiques après migration sont réalisés par lecture au densitomètre BIORAD modèle 620.

VII-ETUDE DES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

A-DETERMINATION DES MASSES MOLECULAIRES PAR CHROMATOGRAPHIE DE TAILLAGE MOLECULAIRE

Les masses moléculaires ont été déterminées 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. Les fractions étudiées sont injectées 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 les activités enzymatiques mesurées sur chacune d'entre elles.

B-DETERMINATION DU POINT ISOELECTRIQUE PAR CHROMATOFOCALISATION

Les points isoélectriques ont été déterminés 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'éluion 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. Les activités enzymatiques et le pH sont mesurés sur chaque fraction (1 ml) recueillie.

VIII-ETUDE DES PROPRIETES ENZYMATIQUES

A-DETERMINATION DES pH OPTIMAUX

Les pH optimaux ont été déterminés selon le protocole décrit page 47 en utilisant le système tampon citrate/phosphate/borate 100 mM qui couvre une gamme de pH allant de 3,0 à 10. Pour chaque activité 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-DÉTERMINATION DES TEMPÉRATURES OPTIMALES D'ACTION

Les activités sont mesurées dans les conditions standard décrites à la page 47. Les incubations sont réalisées à des températures variant de 37 °C à 55 °C.

C-DÉTERMINATION DES K_m ET V_{max}

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

1-ACTIVITES β -D-GALACTOSIDASIQUES :

Pour les activités galactosidasiques ces paramètres ont été déterminés sur deux substrats différents : le pNP-Gal et le lactose.

a-Détermination sur le pNP-Gal :

L'activité sur le substrat synthétique a été déterminée après 10 minutes de réaction selon le protocole décrit page 47 avec des concentrations finales en substrat de 0,5 à 15 mM dans un système-tampon phosphate de sodium au pH optimal et à la température optimale de l'activité. Les témoins sont réalisés dans les mêmes conditions. La solution enzymatique est diluée dans le tampon de façon à obtenir une concentration finale de 0,42 U par ml.

b-Détermination sur le lactose :

L'activité sur le lactose a été mesurée par dosage du galactose libéré par la galactose déshydrogénase en présence de NAD⁺ et dosé par spectrophotométrie à 340 nm. Le mode opératoire est le suivant :

On mélange 100 μ l de solution enzymatique à 100 μ l de lactose à une concentration variant de 33,3 à 500 mM et à 200 μ l de tampon phosphate de sodium 50 mM au pH optimal de l'activité. Après 40 minutes d'incubation

à la température optimale la réaction est arrêtée par chauffage pendant 3 minutes à 100 °C. Après refroidissement on ajoute 100 µl de NAD⁺ (0,5 µmoles), 40 µl de tampon TRIS/HCl 1,25 M pH 8,6 et 100 µl de galactose déshydrogénase (2,5 U/ml). La réaction s'établit à température ambiante durant 45 minutes.

c-Action des β-D-galactosidases sur différents substrats :

Nous avons déterminé les activités galactosidasiques sur trois substrats :

- le lactose (liaison β 1,4),
- le lacto-N-tétraose (liaison β 1,3),
- le lacto-N-néotétraose (liaison β 1,4).

Ces substrats sont dissous dans un tampon phosphate de sodium 50 mM pH 6,0. Les concentrations des différents substrats ont été calculées pour obtenir la même quantité de galactose libérable (36 µg par tube). 20 µl de substrat et 20 µl de solution enzymatique sont incubés durant 4 heures à 40 °C. 5 µl du mélange sont ensuite déposés sur couche mince (MERCK) et la migration s'effectue dans le système-solvant butanol/ acide acétique/ eau : 2/1/1 (V/V). Après révélation par l'orcinol sulfurique la quantité de galactose apparu et la quantité de substrat hydrolysé sont mesurées au densitomètre BIORAD modèle 620.

2-ACTIVITES N-ACÉTYL-β-D-GLUCOSAMINIDASIQUES :

Les paramètres ont été déterminés sur substrat synthétique : le pNP-N-acétyl-β-D- glucosaminide selon le protocole décrit à la page 47, avec des concentrations finales en pNP-GlcNAc de 0,5 à 6 mM, dans le système tampon phosphate/citrate 0,2/0,1 M au pH optimal et à la température de 48 °C.

3-ACTIVITES α-D-NEURAMINIDASIQUES :

Le K_m et le V_m ont été déterminés sur le 2,4 méthyl-umbelliféryl acide neuraminique selon le protocole décrit à la page 48, 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 48 °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.

IX-ACTION D'EFFECTEURS SUR LES DIFFERENTES ACTIVITES

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. Les réactions enzymatiques ne sont plus arrêtées par du carbonate de sodium mais par du tampon Glycocolle/NaOH 0,2 M pH 10. Les solutions enzymatiques sont préincubées pendant 30 minutes avec les tampons contenant les différents cations, puis le substrat est ajouté pour déclencher la réaction.

X-ACTION DE LA FRACTION MONO Q 0,375 M (Gal^{*} + GlcNAc^{***}) SUR UN MELANGE DE SUBSTRATS**

1-ACTION SUR UN MELANGE DE SUBSTRATS SYNTHETIQUES :

Les pNP-Gal et pNP-GlcNAc sont dilués en tampon phosphate de sodium 50 mM pH 6,0 à la concentration de 5 mM. Les incubations sont réalisées comme suit :

- 0,1 ml de pNP-Gal 5 mM,
- 0,1 ml de pNP-GlcNAc 5 mM,
- préincubation 5 minutes à 48 °C puis adjonction de
- 0,1 ml de fraction enzymatique.

Le tout est incubé 10 minutes à 48 °C et la réaction est ensuite arrêtée par addition de 0,6 ml de Na_2CO_3 1 M.

**2-ACTION SUR LE pNP-GlcNAc EN PRESENCE DE GALACTOSE OU DE N-ACETYL
GLUCOSAMINE :**

La méthode est identique, le mélange de substrats étant constitué de :

- 100 µl de pNP-GlcNAc 5 mM et de
- 100 µl d'une solution de galactose à la concentration de 0, 100, 200, 400 et 800 mM.

ou de :

- 100 µl de pNP-GlcNAc 5 mM et de
- 100 µl d'une solution de N-acétylglucosamine aux concentrations de 0, 100, 200, 400 et 800 mM.

**3-ACTION SUR LE pNP-Gal EN PRESENCE DE GALACTOSE OU DE N-ACETYL
GLUCOSAMINE :**

La méthode est identique, le mélange de substrats étant constitué de :

- 100 µl de pNP-Gal 5 mM et de
- 100 µl d'une solution de galactose aux concentrations de 0, 100, 200, 400 et 800 mM.

ou de :

- 100 µl de pNP-Gal 5 mM et de
- 100 µl d'une solution de N-acétylglucosamine aux concentrations de 0, 100, 200, 400 et 800 mM.

**4-ACTION SUR LE pNP-GAL OU SUR LE pNP-GlcNAc EN PRESENCE DE PARA
NITROPHENOL**

La méthode est identique, le para nitrophénol est dilué en tampon phosphate de sodium 50 mM pH 6,0 à la concentration de 0,625 mM. Le mélange étant constitué de :

- 100 µl de pNP-Gal ou GlcNAc 5mM,
- 100 µl de paranitrophénol,
- 100 µl de tampon phosphate de sodium 50 mM pH 6,8,
- 100 µl de fraction enzymatique

RESULTATS

I-PRODUCTION DE *BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM*

La figure 4 (p. 59) montre les résultats obtenus lors du suivi de fermentation de *Bifidobacterium bifidum* souche AA 2/2 fournie par C. ROMOND.

La biomasse se développe rapidement. Après une phase de latence de 10 heures cette biomasse atteint son maximum en 30 heures. La culture est arrêtée après 40 heures de fermentation.

La production en fermenteur, telle qu'elle a été décrite à la page 45, est de 8 grammes de cellules humides par litre, ce qui correspond à 2,5 grammes de matière sèche par litre de culture. Il est à remarquer que l'apparition des différentes activités enzymatiques étudiées est similaire à la croissance de la biomasse. L'optimisation de la production est décrite dans le mémoire de thèse de BOUTRY .

II-EXTRACTION DES ACTIVITES GLYCOSIDASIQUES

Les activités glycosidasiques étudiées sont toutes endocellulaires, aucune de ces activités n'étant excrétée. Après traitement aux ultra-sons, les dosages ont été effectués sur les surnageant et culot de centrifugation, ainsi que nous l'avons décrit page 47. Nous avons détecté des activités β -D-galactosidasiques, N-acétyl- β -D-glucosaminidasiques, α -D-neuraminidasiques et α -L-fucosidasiques dans les deux fractions, ceci pouvant indiquer que ces activités sont membranaires. Aucunes activités α -D-mannosidasique et protéasique n'ont été mises en évidence par les techniques utilisées.

Ce type d'extraction nous a permis d'obtenir de bons rendements pour les activités β -D-galactosidasique et N-acétyl- β -D-glucosaminidasique (respectivement 75 et 63 p.100), ces rendements étant par contre plus faibles pour les activités α -D-neuraminidasique (40 p.100) et α -L-fucosidasique (50 p.100). Cependant, ces rendements sont les meilleurs que nous ayons pu obtenir, d'autres méthodes d'extractions (résultats figurant

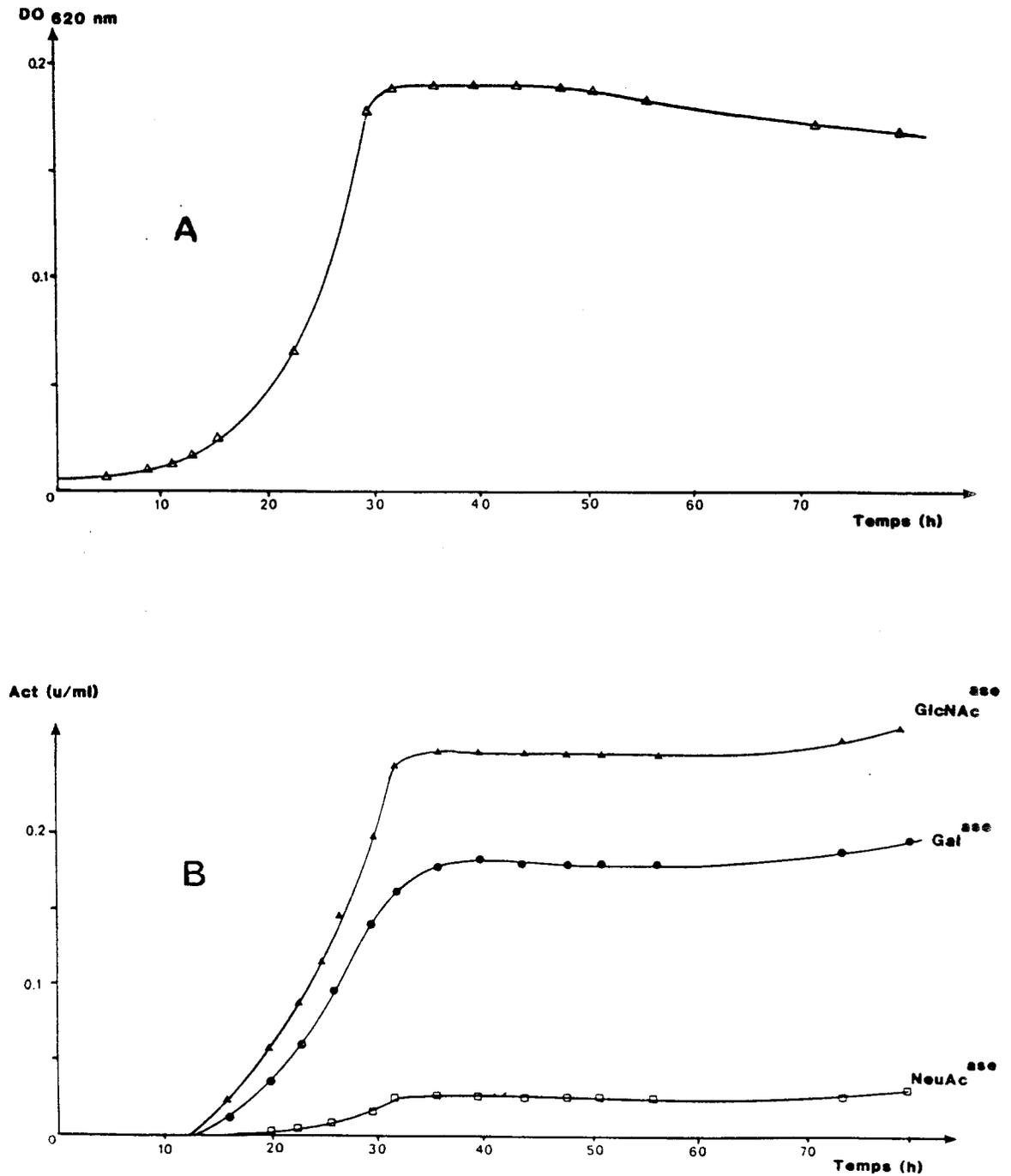


Figure 4: Cinétique de production de la biomasse et des activités exocellulaires lors de la fermentation de *Bifidobacterium bifidum*

A : Production de biomasse

B : Production des activités enzymatiques exocellulaires

* : Act = Activités enzymatiques

dans la thèse d'E. BOUTRY) n'ont pas donné de meilleurs résultats. Les valeurs obtenues figurent dans le tableau XIII, page 61. On peut remarquer une répartition différente des activités enzymatiques. L' α -D-neuraminidase peut être considérée comme étant une enzyme membranaire ou périplasmique, l'expression de l'activité est maximale quand on la dose sur la cellule entière. D'autre part, il est difficile de "solubiliser" celle-ci. 36 p. 100 de l'activité N-acétyl- β -D-hexosaminidase peut être caractérisée comme étant membranaire externe. 10 p. 100 de l'activité α -L-fucosidase serait intégrée en position externe ainsi que 20 p. 100 de l'activité β -D-galactosidase. Les techniques utilisées ne permettent pas de préciser l'emplacement exact des activités enzymatiques. Par exemple, pour les formes solubilisées, il n'est pas possible de savoir s'il s'agit effectivement d'enzyme libre ou de système intégré solubilisé.

III-PURIFICATION DES ACTIVITES GLYCOSIDASIQUES

Le schéma de purification suivi est présenté dans la figure 5, page 62.

A-PURIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE SUR HYDROXYLAPATITE-ULTROGEL

60 ml de surnageant d'ultracentrifugation sont chromatographiés sur colonne d'Hydroxylapatite Ultrogel, comme nous l'avons décrit à la page 49. Le profil d'éluion obtenu est représenté sur la figure 6 (p. 63).

Cette technique nous a permis d'obtenir trois fractions enzymatiques distinctes, qui ont été étudiées plus en détail par la suite, et une fraction correspondant au lavage dont l'étude n'a pas été poursuivie :

1-FRACTION "LAVAGE PIC I" :

Cette fraction renferme 3 p.100 de l'activité β -D-galactosidase, 32 p.100 de l'activité N-acétyl- β -D-glucosaminidase, 41 p.100 de l'activité α -D-neuraminidase, 30 p.100 de l'activité α -L-fucosidase

**TABLEAU XIII: Extraction des activités exoglycosidasiques (*)
par traitement aux ultra-sons**

| Enzymes | Surnageant | Culot | Surnageant+ Culot | Cellules lavées |
|---|-------------------|--------------|------------------------------|----------------------------|
| β-D-Galactosidase | 2280 | 760 | 3040 | 630 |
| N-Acétyle-β-D- hexosaminidase | 515 | 300 | 815 | 300 |
| α-D-Neuraminidase | 30 | 45 | 75 | 88 |
| α-L-Fucosidase | 120 | 120 | 240 | 23 |

(*) Les activités sont exprimées en unités enzymatiques par gramme de matière sèche.

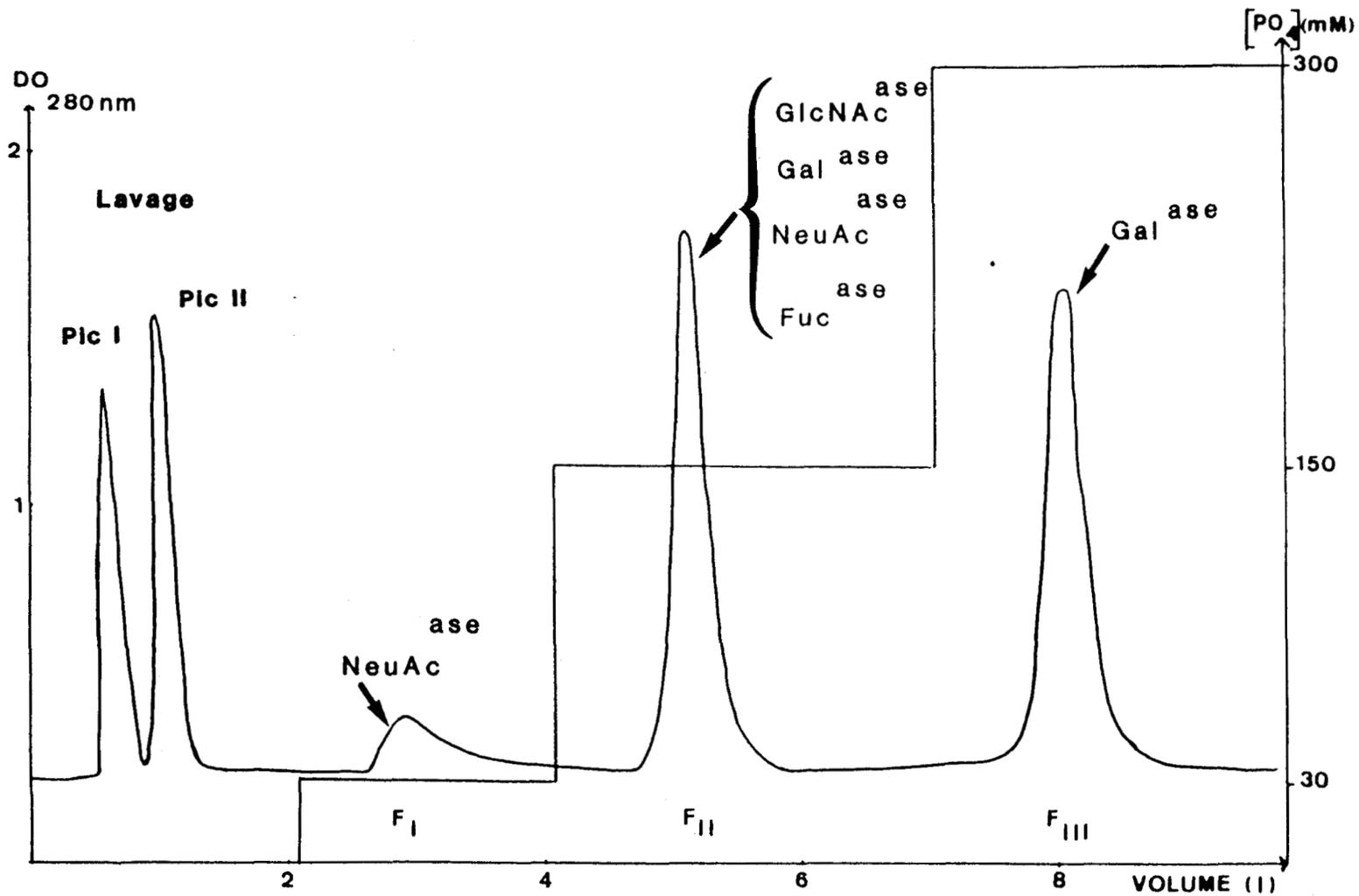


Figure 6 :Chromatographie sur colonne d'Hydroxylapatite Ultrogel

Le surnageant de sondage a été injecté sur colonne d'Hydroxylapatite Ultrogel équilibrée en tampon phosphate de sodium 20 mM pH 6,8 et éluée par un gradient discontinu de phosphate de sodium de 20 à 300 mM.

L'éluion a été suivie par mesure de la densité optique à 280 nm.

et 13 p.100 des protéines totales, ces rendements sont calculés par rapport au surnageant d'ultracentrifugation. Cette fraction ne résulte pas d'une surcharge de la colonne, en effet si on la réinjecte dans les mêmes conditions les activités enzymatiques et les protéines qu'elle contient ne sont toujours pas retenues. Cette fraction n'est pas limpide mais opalescente, il s'agirait de fragments de membranes qui pourraient préalablement être éliminés par gel filtration sur Superose 6 (voir la thèse d'E. BOUTRY).

2-FRACTION F_I :

La fraction "Phosphate 30 mM" ou "Fraction F_I " renferme 36 p.100 de l'activité α -D-neuraminidasique totale, les autres activités glycosidasiques ne dépassant pas 1 p.100 de leur activité initiale. Le taux de purification de cette activité neuraminidasique est de 5,5. Cette fraction a été étudiée en détails par E. BOUTRY.

3-FRACTION F_{II} :

La fraction "Phosphate 150 mM" ou "Fraction F_{II} " contient 33 p.100 de l'activité β -D-galactosidasique, 63 p.100 de l'activité N-acétyl- β -D-glucosaminidasique, 9 p.100 de l'activité α -D-neuraminidasique et 25 p.100 de l'activité α -L-fucosidasique (les rendements sont calculés par rapport aux activités initiales présentes dans le surnageant d'ultracentrifugation). Les taux de purification pour ces différentes activités sont respectivement de 0,63; 1,20; 0,28 et 0,47.

4-FRACTION F_{III} :

La fraction "Phosphate 300 mM" ou "Fraction F_{III} " contient 54 p.100 de l'activité β -D-galactosidasique initiale. Le taux de purification de cette activité dans cette fraction F_{III} est de 2,4..

5-CONCLUSIONS :

En conclusion, la chromatographie sur Hydroxylapatite Ultrogel (Tableau XIV p. 66) permet d'obtenir une α -D-neuraminidase exempte en majeure partie des autres activités exoglycosidasiques (Fraction F_I) ainsi qu'une β -D-galactosidase libre des autres activités (Fraction F_{III}). La récupération des différentes activités et des protéines est bonne, sauf en ce qui concerne l'activité α -L-fucosidasique. Les rendements des différentes activités sont respectivement de :

- 91 p.100 pour l'activité Gal^{***}, dont 3 p.100 dans le "Lavage Pic I", 33 p.100 dans la Fraction F_{II} et 54 p.100 dans la Fraction F_{III} .
- 96 p.100 pour l'activité GlcNAc^{***}, dont 32 p.100 dans le "Lavage Pic I" et 63 p.100 dans la Fraction F_{II} .
- 86 p.100 pour l'activité NeuAc^{***}, dont 41 p.100 dans le "Lavage Pic I", 36 p.100 dans la Fraction F_I et 9 p.100 dans la Fraction F_{II} .
- 56 p.100 pour l'activité Fuc^{***}, dont 30 p.100 dans le "Lavage Pic I" et 25 p.100 dans la Fraction F_{II} .

La récupération des protéines est, quant à elle, de 98 p.100. Les protéines étant présentes dans leur quasi-totalité, on peut supposer que la perte en activité α -L-fucosidasique correspond à une dénaturation de la protéine enzymatique.

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

Nous avons choisi ce système de "Fast Protein Liquid Chromatography" (ou FPLC) pour les avantages que celui-ci représente tant au point de vue vitesse qu'au point de vue reproductibilité des gradients utilisés. Nous avons suivi le protocole décrit à la page 50. Les fractions que nous avons étudiées dans ce système sont les deux fractions F_{II} et F_{III} préalablement concentrées sur minisette FILTRON (seuil de coupure 10.000).

**TABLEAU XIV: Purification des activités exoglycosidasiques sur colonne
d'Hydroxylapatite Ultrogel.**

| Fractions | β-Galactosidase | | N-Acétyle-β-D-hexosaminidase | | α-Neuraminidase | | α-Fucosidase | | Protéine |
|-------------------------|-----------------|------|------------------------------|------|-----------------|-------|--------------|------|----------|
| | AT | AS | AT | AS | AT | AS | AT | AS | mg |
| Surnageant injecté | 5040 | 7 | 1140 | 1,6 | 66 | 0,09 | 276 | 0,38 | 720 |
| Lavage Pic I | 172 | 1,9 | 370 | 4 | 27 | 0,3 | 83 | 0,9 | 92,5 |
| Lavage Pic II | 1 | 0,04 | ND | | ND | | ND | | 24 |
| F _I 30 mM | 3 | 0,06 | 7 | 0,14 | 24 | 0,5 | 3 | 0,06 | 48 |
| F _{II} 150 mM | 1650 | 4,4 | 720 | 1,9 | 6 | 0,016 | 69 | 0,18 | 378 |
| F _{III} 300 mM | 2750 | 16,9 | ND | | ND | | ND | | 162,5 |
| Total | 4576 | | 1097 | | 57 | | 155 | | 705 |

AT: Activité totale en µmoles par minute; AS: Activité spécifique en µmoles par mg de protéine; ND: Non détecté.

1-ETUDE DE LA FRACTION F_{II} :

a-Mode opératoire :

La fraction Phosphate 150 mM F_{II} est injectée sur colonne Mono Q. Après lavage dans le tampon d'équilibrage, on applique sur la colonne un gradient discontinu en NaCl; les paliers sont respectivement de 0,1; 0,25; 0,375; 0,5 et 0,6 M. (Fig.7 et 8; p.68 et 69). Les fractions recueillies sont concentrées par ultrafiltration sur membrane AMICON PM 10.

b-Résultats :

Le tableau XV page 70 récapitule les différentes données de purification :

- La fraction éluée à une concentration en NaCl de 0,1 M (Fraction F_{II} Mono Q 0,1 M) contient 58 p.100 de l'activité α -L-fucosidasique injectée et 2,5 p.100 de l'activité β -D-galactosidasique. Les taux de purification sont respectivement de 13 et de 0,6. Le rapport des activités Gal^{***}/Fuc^{***} est égal à 1.

- La fraction éluée à une concentration en NaCl de 0,25 M (Fraction F_{II} Mono Q 0,25 M) possède 36 p.100 de l'activité N-acétyl- β -D-hexosaminidasique et 87 p.100 de l'activité α -D-neuraminidasique. Les taux de purification de ces deux activités sont de 1 et 2,5 dans cette fraction. Le rapport des activités GlcNac^{***}/NeuAc^{***} est égal à 50.

- La fraction éluée à une concentration en NaCl de 0,375 M (Fraction F_{II} Mono Q 0,375 M) contient 85 p.100 de l'activité β -D-galactosidasique et 41 p.100 de l'activité N-acétyl- β -D-hexosaminidasique. Les taux de purification sont respectivement de 2 et 1. Le rapport des activités Gal^{***}/GlcNac^{***} est égal à 4,7.

- La fraction éluée à une concentration en NaCl de 0,6 M (Fraction F_{II} Mono Q 0,6 M) contient 5 p.100 de l'activité β -galactosidasique initiale avec un taux de purification de 1,6.

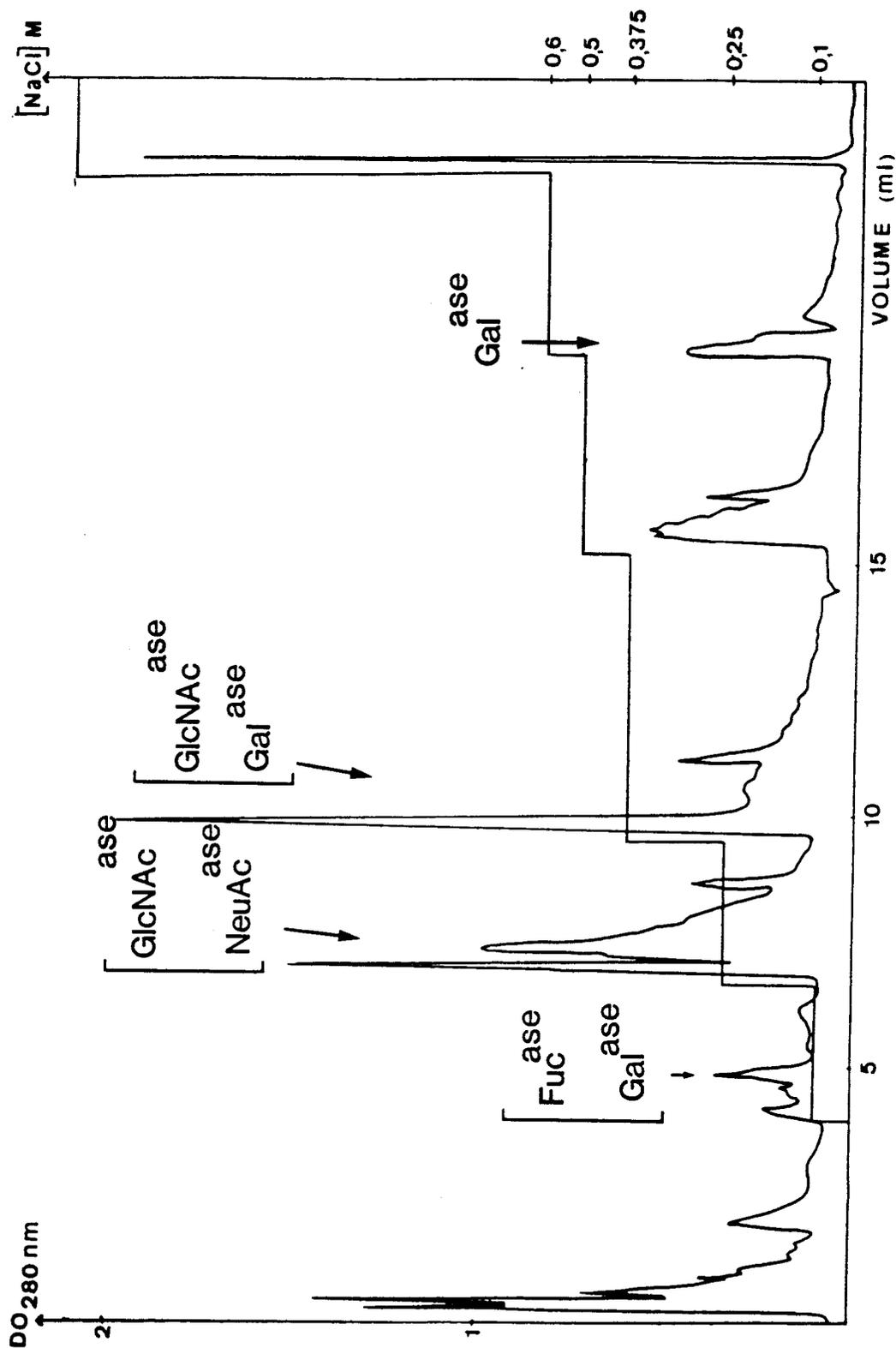


Figure 7 : Chromatographie d'échange d'ions de la fraction F_{II} sur colonne Mono Q.

La fraction d'Hydroxylapatite Ultragel F_{II} a été injectée sur colonne Mono Q équilibrée en tampon phosphate de sodium 20 mM pH 6,8 et éluée par un gradient discontinu de NaCl. L'élué a été suivie par mesure de la densité optique à 280 nm.

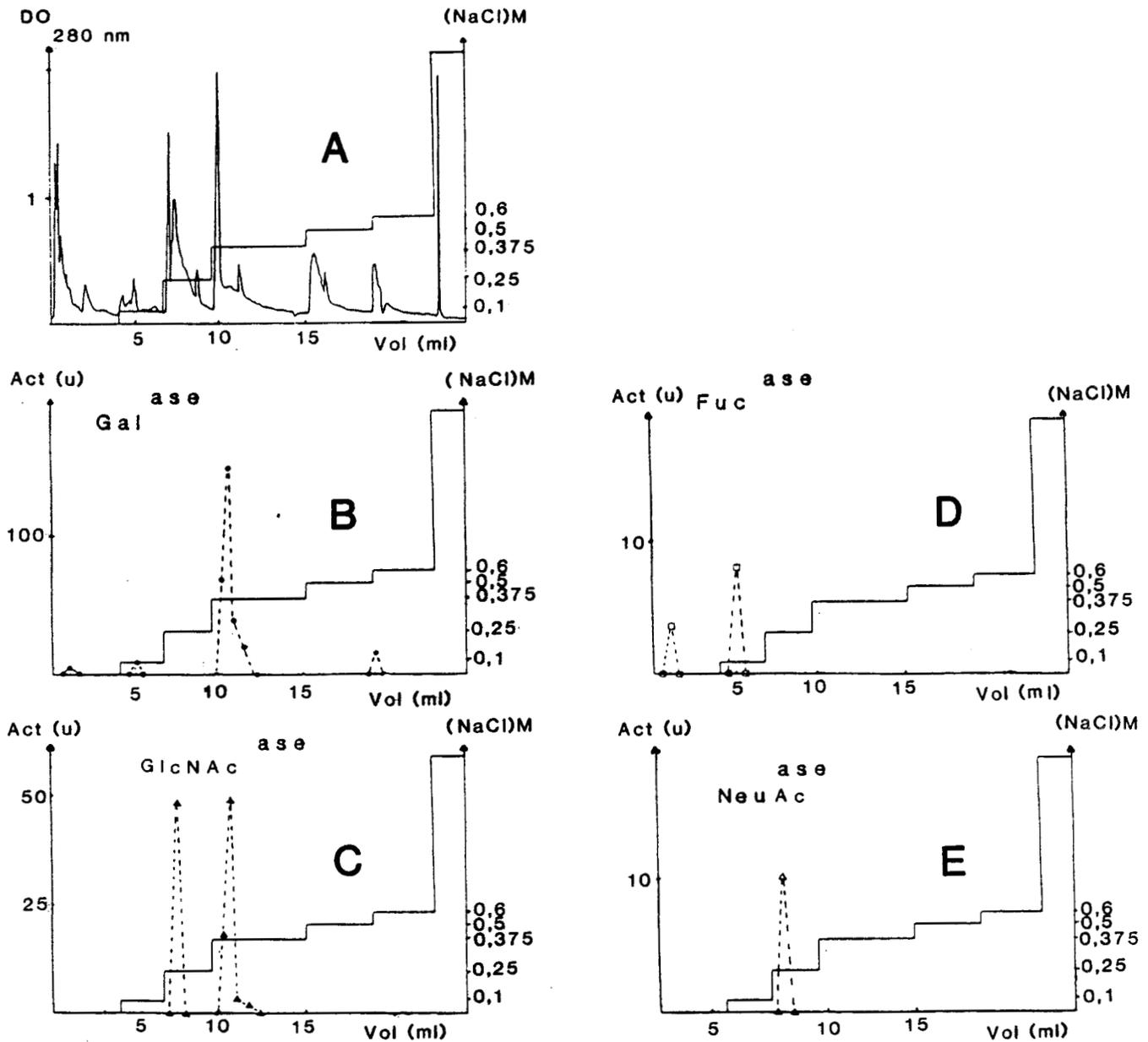


Figure 8 :Chromatographie d'échange d'ions de la fraction F_{II} sur colonne

Mono Q

A :Profil d'éluion à 280 nm (voir p.68)

B,C,D,E :Profil d'éluion des activités exoglycosidasiques étudiées. Les résultats sont exprimés en unités enzymatiques. Les conditions d'incubation sont décrites à la page 47

* Act = Activité enzymatique

TABEAU XV : Purification de la fraction F_{II} par chromatographie d'échanges d'ions sur colonne Mono Q.

| Fractions | β-Galactosidase | | | N-Acetyl-β-D-hexosaminidase | | | α-Neuraminidase | | | α-Fucosidase | | | Proteine |
|-----------------------------------|-----------------|------|-------|-----------------------------|------|-------|-----------------|---------------------|-------|--------------|------|-------|----------|
| | AT | AS | p.100 | AT | AS | p.100 | AT | AS | p.100 | AT | AS | p.100 | mg |
| Fraction F _{II} injectée | 1650 | 4,4 | | 720 | 1,9 | | 6 | 0,016 | | 69 | 0,18 | | 378 |
| Lavage | 25 | 3 | 1,5 | ND | | | 0,03 | 3,610 ⁻³ | 0,5 | 18 | 2,1 | 26 | 8,5 |
| Elution 0,1 M | 42 | 2,6 | 2,5 | 7,2 | 0,44 | 1 | 0,9 | 5,510 ⁻³ | 1,5 | 40 | 2,4 | 58 | 16,5 |
| Elution 0,25 M | 5 | 0,04 | 0,3 | 260 | 1,95 | 36 | 5,2 | 0,04 | 87 | 4 | 0,03 | 6 | 133 |
| Elution 0,375 M | 1400 | 9,3 | 85 | 295 | 1,97 | 41 | 0,18 | 1,210 ⁻³ | 3 | 3 | 0,02 | 4,5 | 150 |
| Elution 0,5 M | | ND | | ND | | | ND | | | ND | | | 38 |
| Elution 0,6 M | 82 | 7,2 | 5 | 7,1 | 0,6 | 1 | 0,06 | 5,210 ⁻³ | 1 | 1 | 0,09 | 1,5 | 11,5 |

AT: Activité totale en µmoles par minute, AS: Activité spécifique en µmoles par mg de protéine, p.100: Rendement pour cent, ND: Non détecté.

c-Conclusions :

La méthode de purification par chromatographie d'échange d'ions que nous avons utilisée nous a permis d'obtenir quatre fractions :

- Une première fraction riche en activités β -D-galactosidasique et α -L-fucosidasique,
- Une seconde fraction possédant surtout une activité N-acétyl- β -D-hexosaminidasique et une faible activité α -D-neuraminidasique,
- Une troisième fraction renfermant des activités β -D-galactosidasique et N-acétyl- β -D-hexosaminidasique,
- Une dernière fraction ne présentant en majorité qu'une activité β -D-galactosidasique.

Cependant, ces quatre fractions contiennent encore toutes les activités enzymatiques étudiées, à l'état de traces pour certaines d'entre elles. Néanmoins, cette méthode chromatographique nous a permis de séparer certaines de ces activités. En outre, les rendements de cette étape se sont révélés excellents, les taux de récupération étant de :

- 94 p.100 pour l'activité Gal^{***},
- 79 p.100 pour l'activité GlcNAc^{***},
- 93 p.100 pour l'activité NeuAc^{***},
- 96 p.100 pour l'activité Fuc^{***},

Le rendement en protéines est, quant à lui, de 94 p.100.

A cette étape de purification, il n'est pas possible de conclure à la coexistence de systèmes enzymatiques obtenus par le hasard de la procédure de fractionnement, ou à l'existence d'un système organisé.

2-ETUDE DE LA FRACTION F_{III} :

La fraction Phosphate 300 mM F_{III} est injectée sur colonne Mono Q HR 5/5 comme nous l'avons décrit à la page 50. Après lavage par le tampon d'équilibrage on applique sur la colonne un gradient continu en NaCl de 0 à 0,9 M suivi d'un palier à la concentration de 1,5 M (Fig. 9;p. 72). Les fractions recueillies sont concentrées sur membrane AMICON PM 10.

75 p.100 de l'activité β -D-galactosidasique injectée sont élués à une concentration en NaCl de 0,4 M (Pic 1). Les Pics 2 et 3 renferment respectivement 2 et 10 p.100 de l'activité.

Le taux de purification de cette étape est de 51, et de 124 par

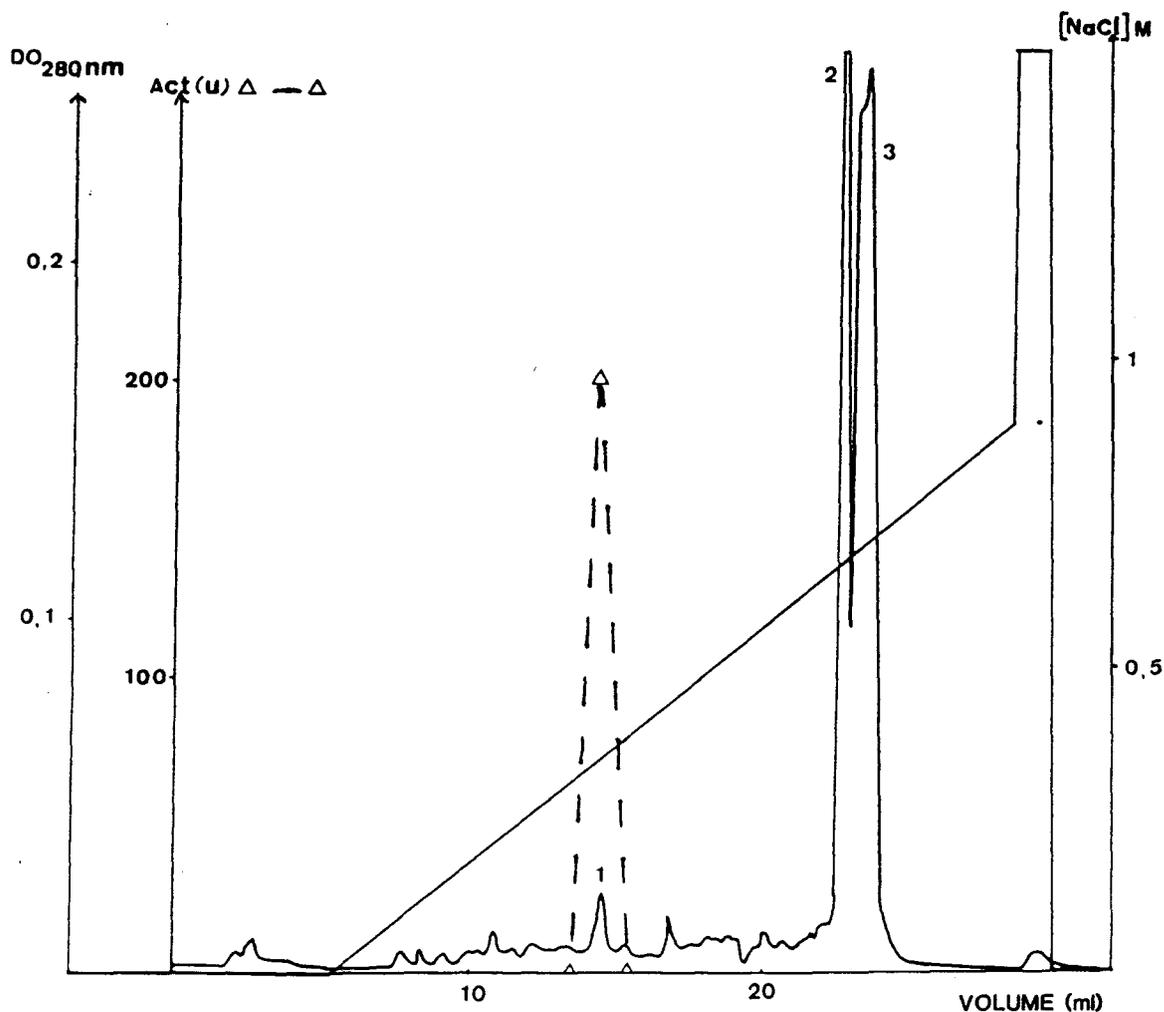


Figure 9: Chromatographie d'échanges d'ions de la fraction F_{III} sur colonne Mono Q.

La fraction d'Hydroxylapatite Ultrogel F_{III} a été injectée sur colonne Mono Q équilibrée en tampon phosphate de sodium 20 mM pH 6,8 et éluée par un gradient linéaire de NaCl de 0 à 0,9 M. L'élué a été suivie par mesure de la densité optique à 280 nm. L'activité β -D-galactosidase est exprimée en unités enzymatiques, elle a été détectée dans les pics 1, 2 et 3.

* Act = Activité enzymatique

rapport au surnageant d'ultracentrifugation de départ. L'activité β -D-galactosidasique purifiée s'est révélée exempte de toute autre activité exoglycosidasique.

C-CHROMATOGRAPHIE D'INTERACTION HYDROPHOBE SUR OCTYL SEPHAROSE CL 4B

Cette méthode de chromatographie nous permet d'éliminer les dernières activités contaminantes présentes dans les différentes fractions purifiées sur colonne Mono Q. Les fractions que nous avons étudiées dans ce système sont les suivantes :

- Fraction F₁₁ Mono Q 0,100 M,
- Fraction F₁₁ Mono Q 0,250 M,
- Fraction F₁₁ Mono Q 0,375 M,
- Fraction F₁₁ Mono Q 0,600 M,
- Fraction F₁₁₁ Mono Q 0,4 M.

La figure 10 page 74 donne un exemple de gradient établi et de profil protéique obtenu. Les activités présentes dans les 5 fractions étudiées sont retenues en tampon phosphate de sodium 5 mM pH 6,8 , NaCl 2 M.

1-ETUDE DE LA FRACTION F₁₁ MONO Q 0,1 M :

Cette fraction contenait essentiellement une activité β -D-galactosidasique et une activité α -L-fucosidasique. Après concentration sur membrane AMICON PM 10 la solution enzymatique est stabilisée dans le tampon d'équilibrage de la colonne (comme décrit p.50). Après lavage de la colonne on applique un gradient discontinu descendant de NaCl. Les activités β -D-galactosidasiques et α -L-fucosidasiques sont toutes deux éluées en fin de chromatographie (en absence de NaCl). Les taux de récupération obtenus à cette étape sont de 71 p.100 pour l'activité β -D-galactosidasique et 77 p.100 pour l'activité α -L-fucosidasique. Les taux de purification sont de 7,7 (Gal^{***}) et 8,6 (Fuc^{***}). (Tableau XVI p.75). Le rapport Gal^{***}/Fuc^{***} est égal à 1.

2-ETUDE DE LA FRACTION F₁₁ MONO Q 0,25 M :

Cette fraction contient les activités N-acétyl- β -D-hexosaminidasique et α -L-neuraminidasique. Après lavage de la colonne, on applique un gradient décroissant discontinu en NaCl, permettant d'éluier conjointe-

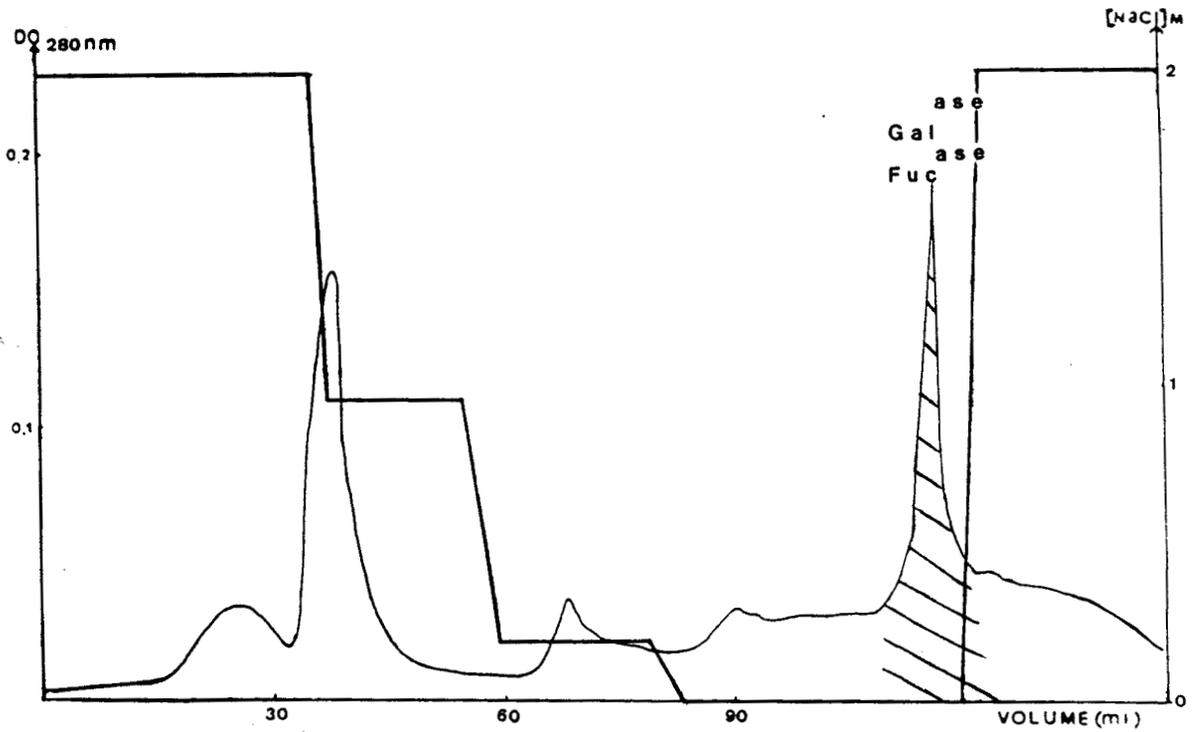


Figure 10: Chromatographie d'interactions hydrophobes de la fraction F_{II}
Mono Q 0.1M sur colonne d'Octyl Sepharose 4B.

La fraction F_{II} Mono Q 0,1 M a été injectée sur colonne d'Octyl Sepharose équilibrée en tampon phosphate de sodium 5 mM NaCl 2 M et éluee par un gradient décroissant discontinu de NaCl de 2 M à 0. L'élution a été suivie par mesure de la densité optique à 280 nm.

TABLEAU XVI: Purification de la fraction F_{II} Mono Q 0,1 M

| Fractions | β-Galactosidase | | | | α-Fucosidase | | | | Rapport |
|-----------------------------|-----------------|------|-------|-----|--------------|------|-------|------|--|
| | AT | AS | p.100 | F | AT | AS | p.100 | F | Gal ^{ase} /Fuc ^{ase} |
| Surnageant de sonnage | 5040 | 7 | | | 276 | 0,38 | | | 18 |
| Fraction F _{II} | 1650 | 4,4 | 33 | 0,6 | 69 | 0,2 | 25 | 0,5 | 24 |
| Fraction Mono Q 0,1 M | 42 | 2,6 | 0,8 | 0,4 | 40 | 2,4 | 14,5 | 6,3 | 1 |
| Fraction Octyl- Sephrose | 30 | 20,6 | 0,6 | 2,8 | 31 | 20,7 | 11 | 54,5 | 1 |

AT : Activité totale en µmoles par minute, AS : Activité
spécifique en µmoles par mg de protéine, p.100 : Rendement
pour cent, F : Facteur de purification

ment les deux activités en fin de chromatographie (en absence de NaCl). Les taux de récupération sont de 83 p.100 (GlcNAc^{***}) et de 85 p.100 (NeuAc^{***}), les taux de purification sont respectivement de 2,3 et 2,5. Le rapport GlcNAc^{***}/NeuAc^{***} est de 50 (Tableau XVII p.77).

3-ETUDE DE LA FRACTION F_{II} MONO Q 0,375 M :

Cette fraction possède les activités β -D-galactosidasique et N-acétyl- β -D-hexosaminidasique. Ces deux activités sont éluées ensemble dans les mêmes conditions que les fractions précédemment étudiées. Les rendements sont de 77 p.100 (Gal^{***}) et de 36,5 p.100 (GlcNAc^{***}), les facteurs de purification de 2,6 et 1 et le rapport Gal^{***}/GlcNAc^{***} de 10. On constate que ce rapport ne reste pas constant lors de la dernière étape de purification ,contrairement aux deux fractions contenant deux activités. Cette variation peut être due à l'existence d'une association aléatoire des enzymes présentes dans cette fraction (Tableau XVIII p. 78).

4-ETUDE DE LA FRACTION F_{II} MONO Q 0,6 M :

Cette fraction ne contient qu'une activité β -D-galactosidasique. Après lavage, cette activité est éluée dans les mêmes conditions que précédemment (en absence de NaCl), le rendement est de 42 p.100, le facteur de purification est de 194 (Tableau XIX p.79).

5-ETUDE DE LA FRACTION F_{III} MONO Q:

L'activité β -D-galactosidasique présente dans cette fraction est éluée pour une concentration en NaCl de 0,2 M. On récupère ainsi 54 p.100 de l'activité initiale avec un taux de purification de 3,2 (Tableau XX p.80).

6-CONCLUSION :

Il est à noter que, sauf dans le cas de la fraction F_{III} Mono Q toutes les protéines porteuses des activités exoglycosidasiques étudiées ont des propriétés hydrophobes très élevées. Ceci est un point en faveur de leur possible localisation membranaire.

Si cette méthode chromatographique nous a permis d'éliminer

TABLEAU XVII: Purification de la fraction F_{II} Mono Q 0,25 M

| Fractions | N-Acétyle-β-D-hexosaminidase | | | | α-Neuraminidase | | | | Rapport GlcN ^{ase} /Neu ^{ase} |
|-----------------------------|------------------------------|-----|-------|-----|-----------------|------|-------|------|--|
| | AT | AS | p.100 | F | AT | AS | p.100 | F | |
| Surnageant de sonnage | 1140 | 1,6 | | | 66 | 0,9 | | | 17 |
| Fraction F _{II} | 720 | 1,9 | 63 | 1,2 | 6 | 0,02 | 9 | 0,02 | 120 |
| Fraction Mono Q 0,25 M | 260 | 1,9 | 23 | 1,2 | 5,2 | 0,04 | 8 | 0,04 | 50 |
| Fraction Octyl- Sephrose | 222 | 4,5 | 19 | 2,8 | 4,5 | 0,1 | 7 | 0,1 | 49 |

AT : Activité totale en µmoles par minute, AS : Activité spécifique en µmoles par mg de protéine, p.100 : Rendement pour cent, F : Facteur de purification

TABLEAU XVIII: Purification de la fraction F_{II} Mono Q 0,375 M

| Fractions | β-Galactosidase | | | | N Acétyl-β-D-hexosaminidase | | | | Rapport Gal ^{ase} /GlcNAC ^{ase} |
|-----------------------------|--------------------------|------|-------|-----|-----------------------------|------|-----------------|-----|--|
| | AT | AS | p.100 | F | AT | AS | p.100 | F | |
| | Surnageant de sonnage | 5040 | 7 | | | 1140 | 1,6 | | |
| Fraction F _{II} | 1650 | 4,4 | 33 | 0,6 | 720 | 1,9 | 63 | 1,2 | 2,3 |
| Fraction Mono Q 0,375 M | 1400 | 9,3 | 28 | 2,1 | 295 | 2 | 26 _d | 1,2 | 4,7 |
| Fraction Octyl- Sepharse | 1080 | 24 | 21 | 3,4 | 108 | 2,1 | 9,5 | 1,3 | 10 |

AT : Activité totale en µmoles par minute, AS : Activité spécifique en µmoles par mg de protéine, p.100 : Rendement pour cent, F : Facteur de purification

TABLEAU XIX: Purification de la β -galactosidase de la fraction

F_{II} Mono Q 0,6 M

| Fractions | AT | AS | p.100 | F |
|------------------------------|------|------|-------|-----|
| Surnageant de sonnage | 5040 | 7 | | |
| Fraction F _{II} | 1650 | 4,4 | 33 | 0,6 |
| Fraction Mono Q | 82 | 7,2 | 1,6 | 1 |
| Fraction Octyl- Sepharose | 35 | 1400 | 0,7 | 200 |

AT : Activité totale en μ moles par minute, AS : Activité
spécifique en μ moles par mg de protéine, p.100 : Rendement
pour cent, F : Facteur de purification

TABLEAU XX: Purification de la β -D-galactosidase de la fraction F_{III}

| Fractions | AT | AS | p.100 | F |
|------------------------------|------|------|-------|-----|
| Surnageant de sonnage | 5040 | 7 | | |
| Fraction F _{III} | 2750 | 17 | 54 | 2,4 |
| Fraction Mono Q | 2063 | 870 | 41 | 124 |
| Fraction Octyl- Sepharose | 1120 | 2800 | 54 | 400 |

AT : Activité totale en μ moles par minute, AS : Activité
spécifique en μ moles par mg de protéine, p.100 : Rendement
pour cent, F : Facteur de purification

certaines protéines contaminantes des activités exoglycosidasiques purifiées, elle ne nous a pas permis de dissocier les activités présentes conjointement dans certaines des fractions (Fractions F₁₁ Mono Q en particulier).

D-CONCLUSION

Le schéma de purification que nous avons suivi (Fig. 5;p. 62) nous a permis d'isoler deux activités β -D-galactosidasiques distinctes, libres de toute autre activité exoglycosidasique, avec des facteurs de purification de 200 pour la fraction F₁₁ Mono Q 0,6 M et de 400 pour la fraction F₁₁₁. De plus, nous obtenons trois fractions contenant chacune deux activités :

- β -D-galactosidase et α -L-fucosidase ,
- N-acétyl- β -D-hexosaminidase et α -D-neuraminidase ,
- β -D-galactosidase et N-acétyl- β -D hexosaminidase.

Nous avons tenté de séparer ces activités en utilisant différentes méthodes chromatographiques : gel-filtration sur Superose 6 et 12, chromatographie d'affinité sur pNP-thiogalactoside Agarose (SIGMA), sur p-aminophényl acide oxamique Agarose (SIGMA), sur ϵ -aminocaproyl fucosylamine Agarose (SIGMA) et sur ϵ -aminocaproyl N-acétyl hexosaminide Sepharose, ainsi que sur gels colorés (kit dye matrex AMICON). Aucune de ces chromatographies n'a donné de résultats satisfaisants : il nous a été impossible de dissocier les deux activités présentes dans les trois fractions étudiées. Ceci nous amène à émettre l'hypothèse de l'existence d'associations moléculaires d'enzymes ou de systèmes enzymatiques portant plusieurs activités.

IV-ETUDE PAR ELECTROPHORESE EN CONDITIONS DENATURANTES ET NON-DENATURANTES DES DIFFERENTES FRACTIONS

A-SUIVI DE LA PURIFICATION PAR ELECTROPHORESE EN CONDITIONS DENATURANTES

Les électrophorèses sont réalisées en gel de polyacrylamide 5-15 p.100 en présence de SDS et de β -mercaptoéthanol, dans lequel la séparation des protéines est uniquement fonction de leur masse moléculaire (conditions décrites p.51). Les figures 11 à 15 présentées pages 83 à 87 illustrent l'évolution de la purification des protéines depuis l'extrait brut jusqu'à l'étape ultime de chromatographie sur Octyl Sepharose. La relation linéaire existant entre le logarithme (\log_{10}) de la masse moléculaire et le coefficient de migration (R_F) des protéines nous a permis de déterminer graphiquement les masses moléculaires relatives des sous-unités des protéines porteuses des activités enzymatiques étudiées.

- Les fractions F_{III} et F_{II} Mono Q 0,6 M (ne contenant que des activités β -D-galactosidasiques) ne présentent chacune qu'une seule bande, ayant respectivement, pour masse relative, 83.000 et 58.000. La lecture au densitomètre montre qu'elles représentent en protéines totales respectivement 80 et 96 p.100.

- Pour la fraction F_{II} Mono Q 0,375 M (renfermant les activités β -D-galactosidasique et N-acétyl- β -D-hexosaminidasique), on révèle quatre bandes de masses moléculaires relatives 94.000, 86.000, 63.000 et 50.000. La lecture au densitomètre nous donne des proportions de 20, 41, 16 et 22 p.100.

- Pour la fraction F_{II} Mono Q 0,25 M (contenant les activités N-acétyl hexosaminidasique et α -D-neuraminidasique), on obtient deux bandes majeures, ayant pour masses relatives 87.000 et 28.000. Les pourcentages obtenus au densitomètre sont de 28 et 45 p.100.

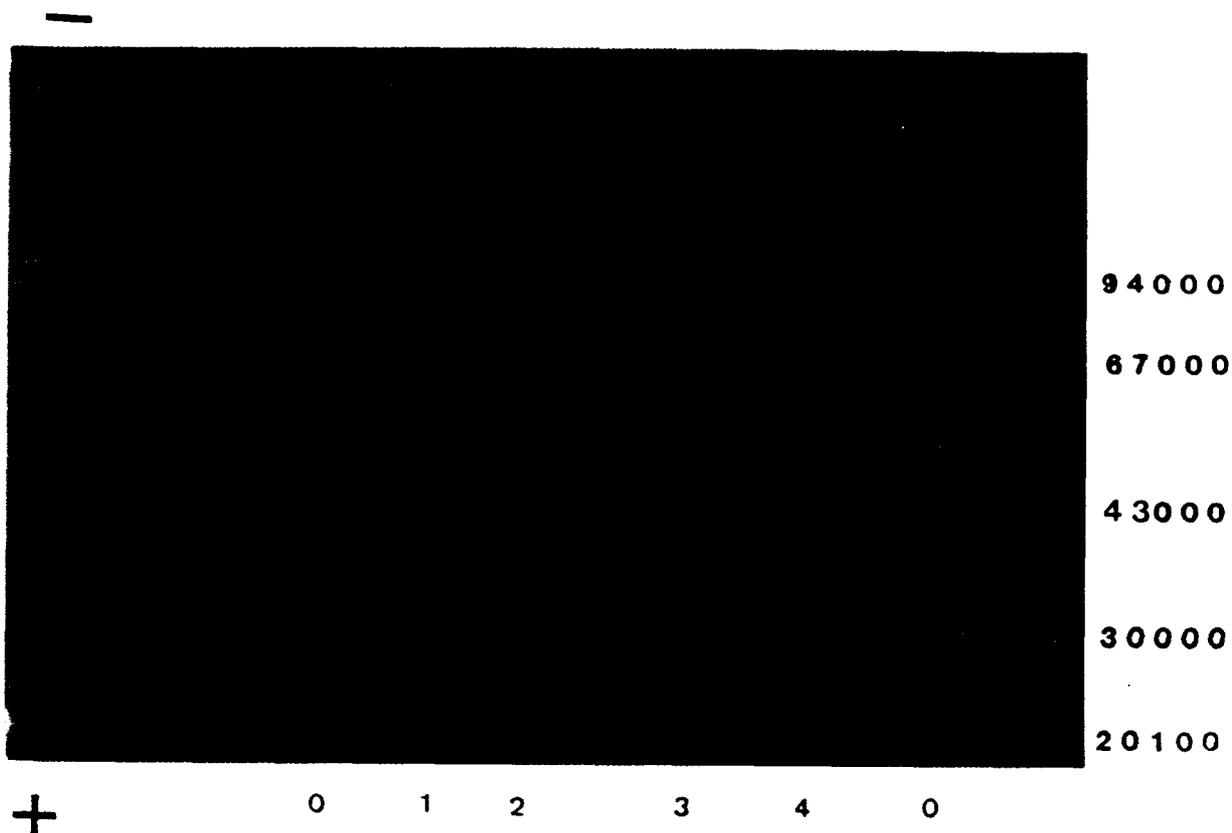


FIGURE 11 - ELECTROPHORESE EN SDS PAGE DES FRACTIONS OBTENUES A PARTIR DE LA FRACTION F_{III} (voir p.80)

- 0) temoins de masses moléculaires
- 1) Extrait de traitement aux ultra-sons
- 2) Fraction F_{III} Hydroxylapatite Ultrogel
- 3) Fraction F_{III} Mono Q
- 4) Fraction F_{III} Mono Q Octyl Sepharose



PROFIL AU DENSITOMETRE DE LA FRACTION F_{III} MONO Q OCTYL SEPHAROSE (puits 4 de l'electrophorèse ci-dessus)

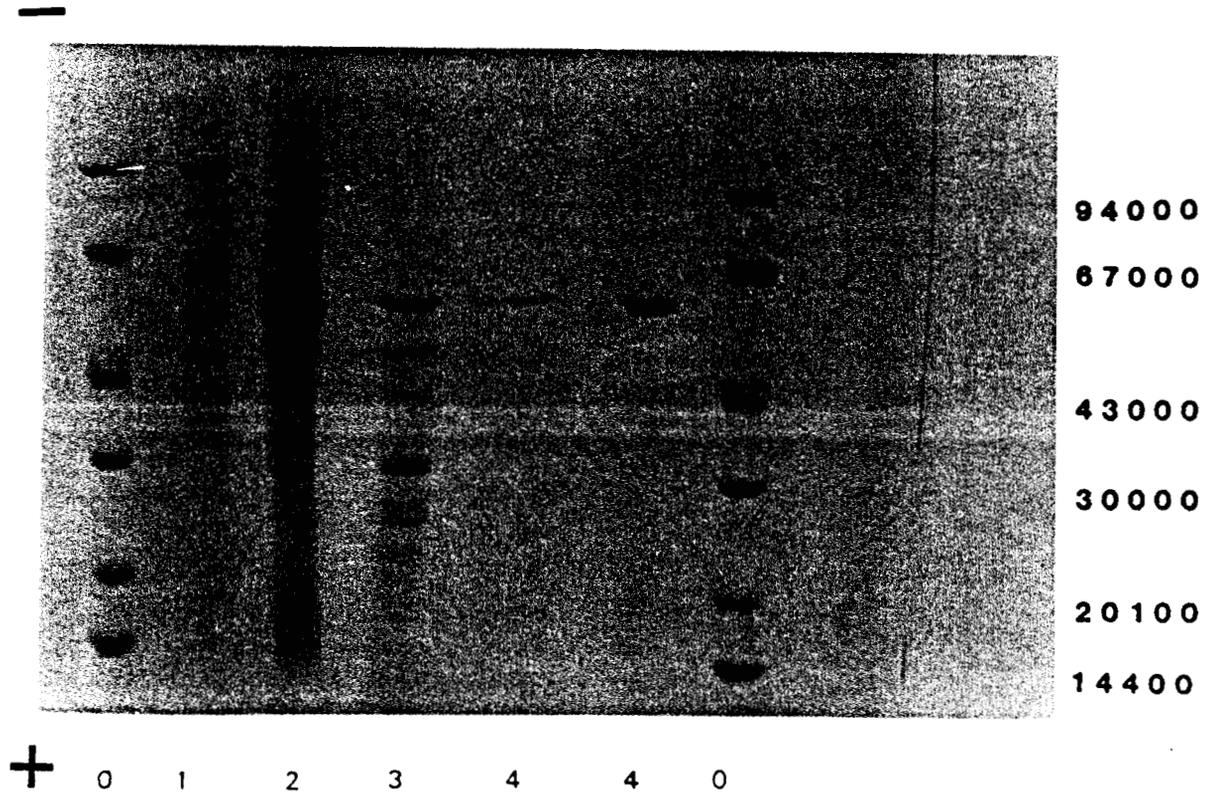
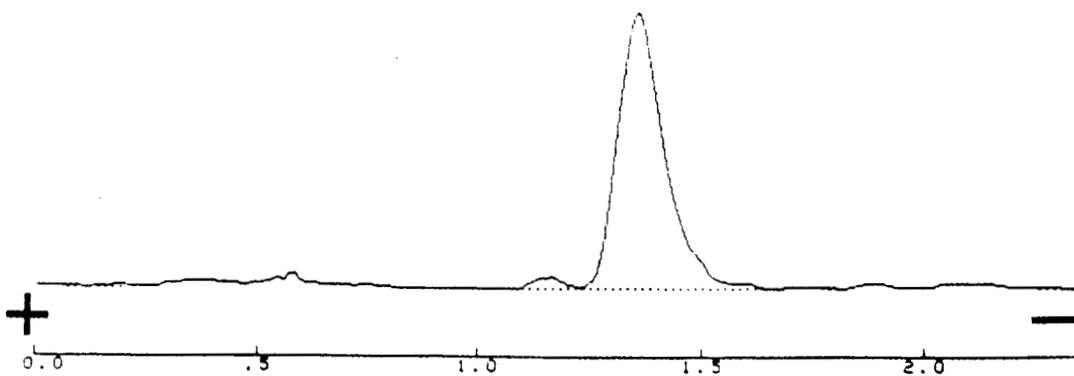


FIGURE 12: SUIVI DE LA PURIFICATION DE LA FRACTION F_{II} MONO Q 0,6 M PAR ELECTROPHORESE EN SDS PAGE

- 0) Témoins de masses moléculaires
- 1) Extrait de traitement aux ultra-sons
- 2) Fraction F_{II} Hydroxylapatite Ultrogel
- 3) Fraction F_{II} Mono Q 0.6M
- 4) Fraction F_{II} Mono Q 0.6M Octyl Sepharose



PROFIL AU DENSITOMETRE DE LA FRACTION F_{II} MONO Q 0,6M OCTYL SEPHAROSE (puits 4 de l'electrophorèse ci-dessus)

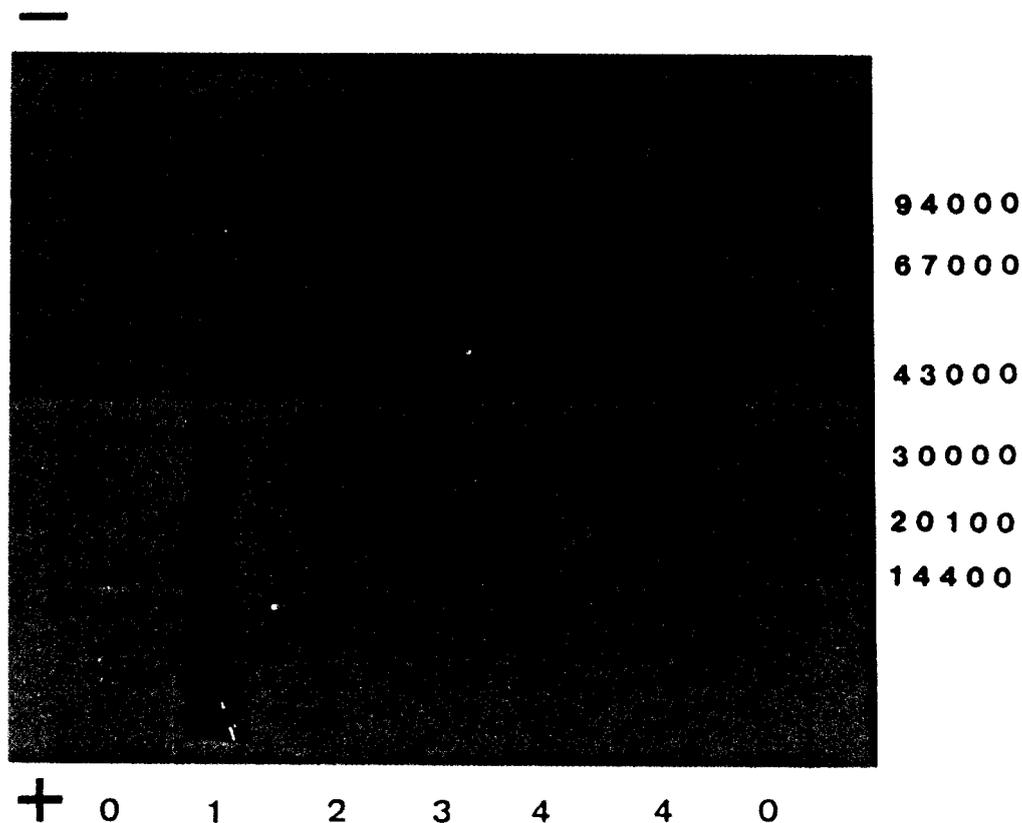
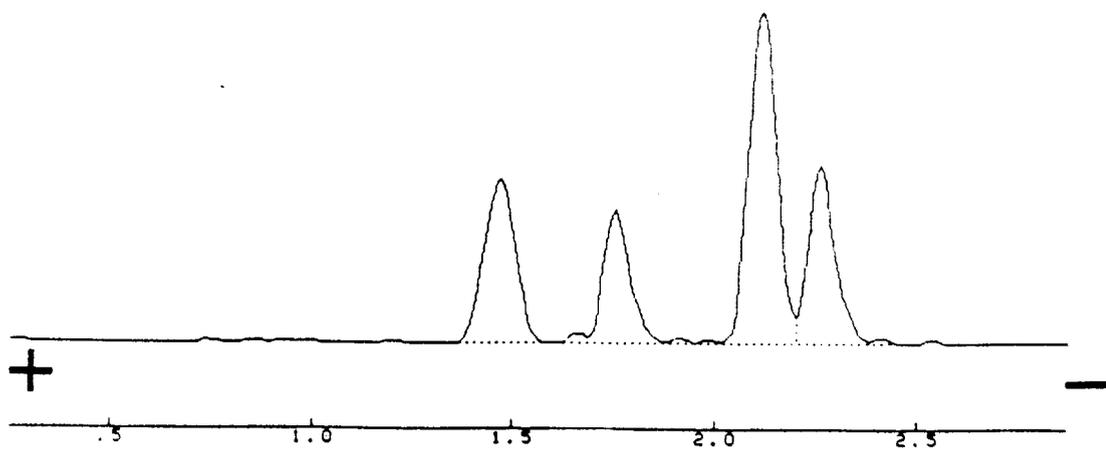


FIGURE 13: SUIVI DE LA PURIFICATION DE LA FRACTION F_{II} MONO Q 0.375M PAR ELECTROPHORESE EN SDS PAGE

- 0) Témoins de masses moléculaires
- 1) Extrait de traitement aux ultra-sons
- 2) Fraction F_{II} Hydroxylapatite Ultrogel
- 3) Fraction F_{II} Mono Q 0.375M
- 4) Fraction F_{II} Mono Q 0.375M Octyl Sepharose



PROFIL AU DENSITOMETRE DE LA FRACTION F_{II} MONO Q 0,375 M OCTYL SEPHAROSE (puits 4 de l'electrophorèse ci-dessus)

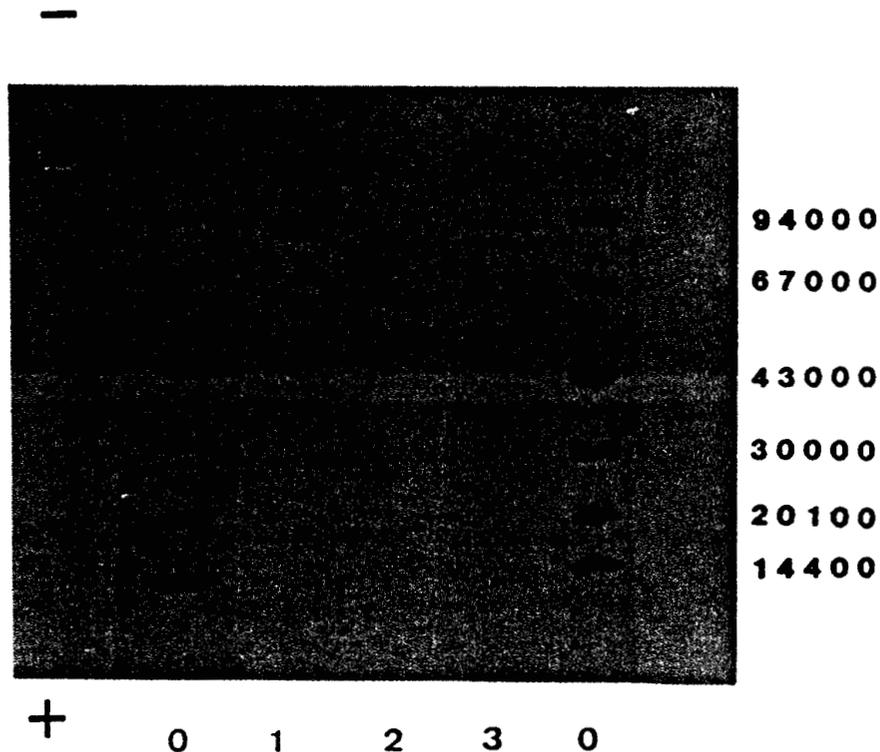


FIGURE 14 : ELECTROPHORESE EN CONDITIONS DENATURANTES DES FRACTIONS F_{II} MONO Q 0.375M ET 0.6M ET DE LA FRACTION F_{III} APRES OCTYL SEPHAROSE

0) Témoins de masses moléculaires

1) Fraction F_{III}

2) Fraction F_{II} Mono Q 0.6M

3) fraction F_{II} Mono Q 0.375M

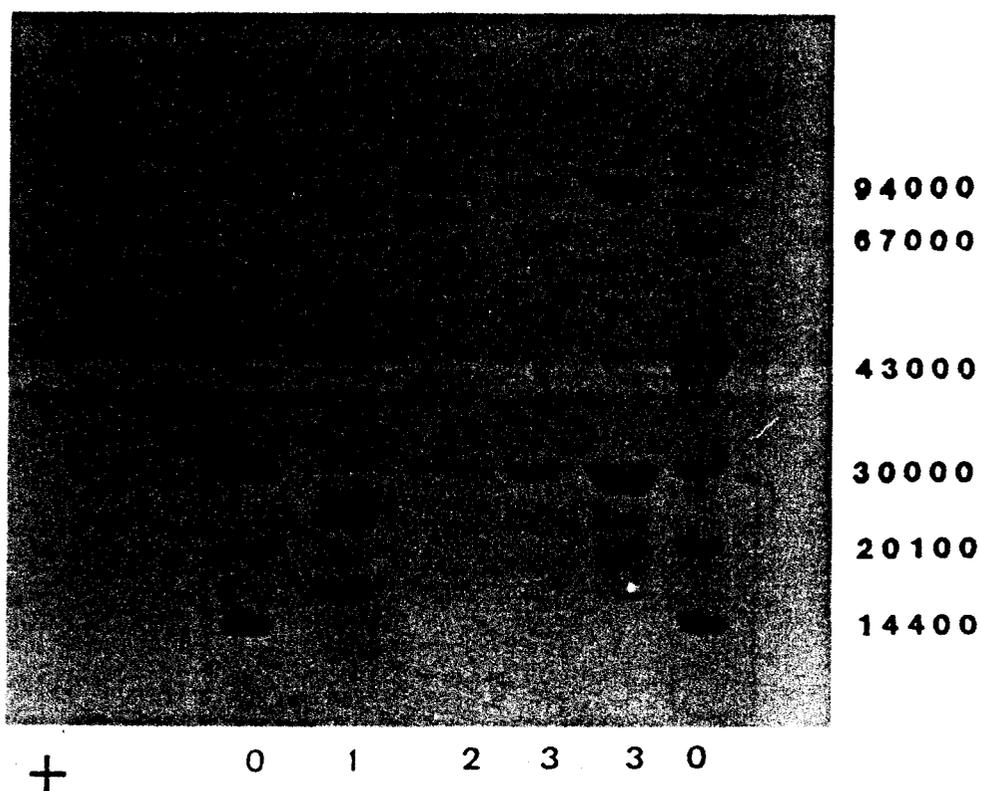
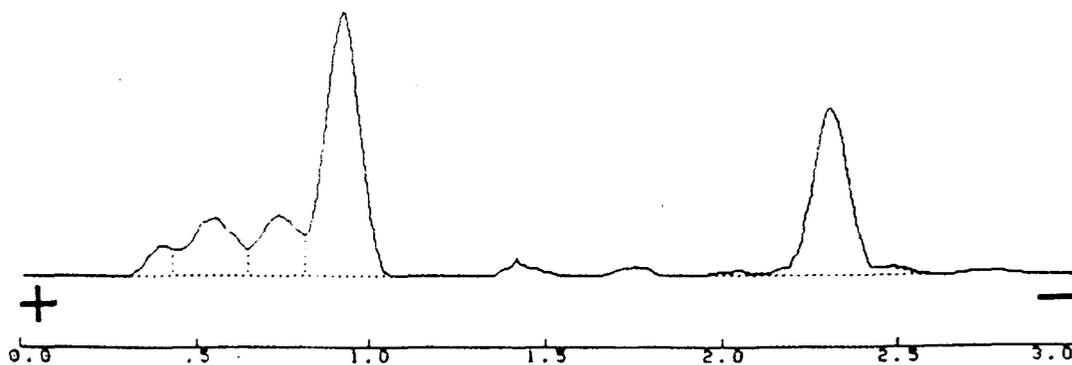


FIGURE 15 : SUIVI DE LA PURIFICATION DE LA FRACTION F_{II} MONO Q 0.25M PAR ELECTROPHORESE EN SDS PAGE

- 0) Témoins de masses moléculaires
- 1) Fraction F_{II} Hydroxylapatite Ultrogel
- 2) Fraction F_{II} Mono Q 0.25M
- 3) Fraction F_{II} Mono Q 0.25M Octyl Sepharose



PROFIL AU DENSITOMETRE DE LA FRACTION F_{II} MONO Q 0,25 M PAR ELECTROPHORESE EN SDS PAGE (puits 3 de l'electrophorèse ci-dessus)

B-REVELATION DES ACTIVITES APRES MIGRATION ELECTROPHORETIQUE EN CONDITIONS NON DENATURANTES

Ces électrophorèses sont réalisées en gel de polyacrylamide 5-15 p.100; celles-ci permettent de séparer les protéines en fonction de leur charge et de leur masse moléculaire (voir le mode opératoire décrit p.51). Les figures 16 à 18 présentées pages 89 à 92 ne mettent en évidence qu'une seule bande par fraction purifiée. Après transfert des protéines, les différentes activités ont été révélées.

- La bande unique révélée pour les fractions F_{III} et F_{II} Mono Q 0,6 M correspond bien à une activité β -D-galactosidasique.
- La protéine de la fraction F_{II} Mono Q 0,1 M porte une activité β -D-galactosidasique et, après découpage du gel, nous avons pu détecter également une activité α -L-fucosidasique.
- A l'emplacement de la bande protéique de la fraction F_{II} Mono Q 0,25 M on met en évidence deux activités différentes : N-acétyl- β -D-hexosaminidasique et α -D-neuraminidasique.
- Enfin, les activités β -D-galactosidasique et N-acétyl- β -D-hexosaminidasique de la fraction F_{II} Mono Q 0,375 M sont révélées toutes deux à l'emplacement de la bande protéique.

C-CONCLUSIONS

De l'étude des différentes électrophorèses effectuées nous pouvons tirer les éléments suivants :

- Dans les deux types d'électrophorèse, les deux fractions F_{III} et F_{II} Mono Q 0,6 M ne présentent chacune qu'une bande visible,
- Les fractions F_{II} Mono Q 0,25 M et 0,375 M possédant deux activités exoglycosidasiques présentent respectivement deux et quatre bandes majeures dans des conditions dénaturantes, et une seule bande apparente dans des conditions non dénaturantes. Ceci est en faveur de l'existence d'édifices polycaténaires de monomères différents.

ACTIVITES ENZYMATIQUES

PROTEINES

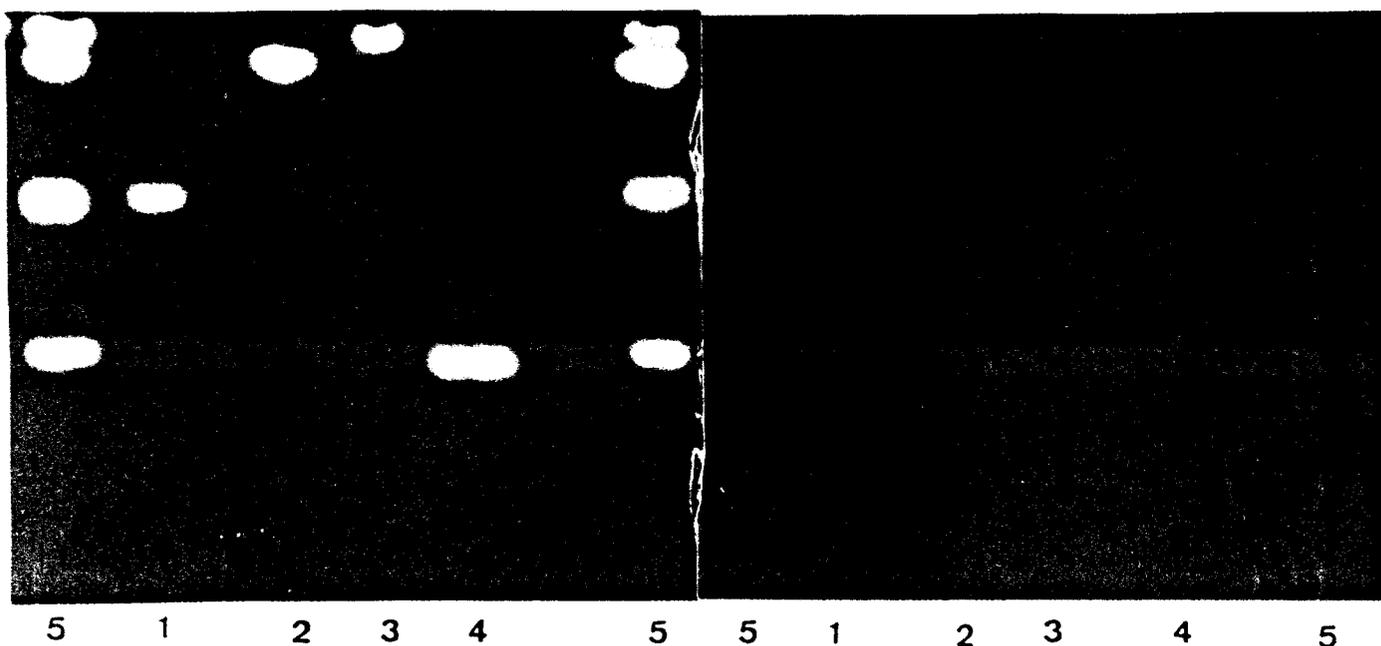
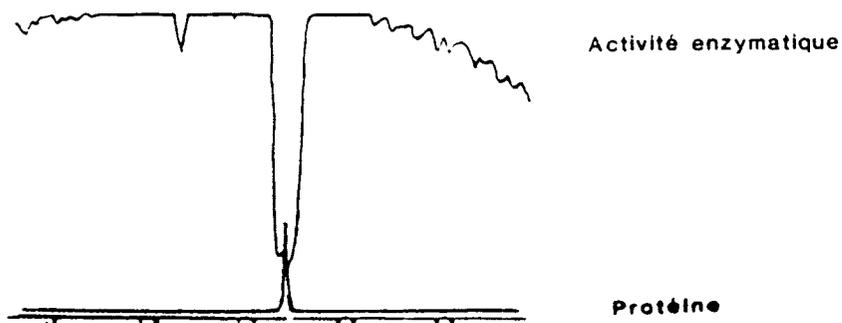
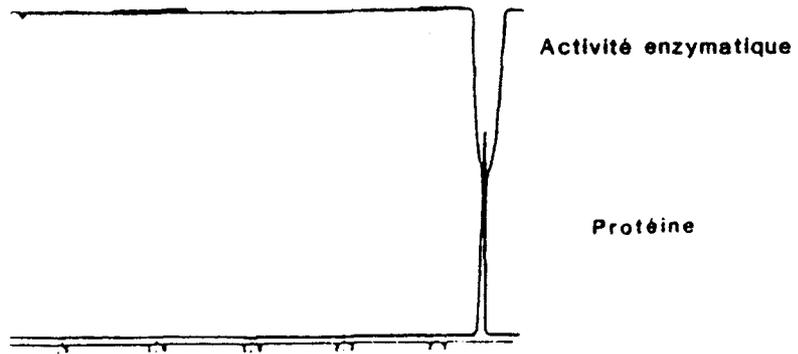


FIGURE 16: REVELATION DES ACTIVITES GALACTOSIDASIQUES APRES ELECTROPHORESE EN CONDITIONS NON DENATURANTES

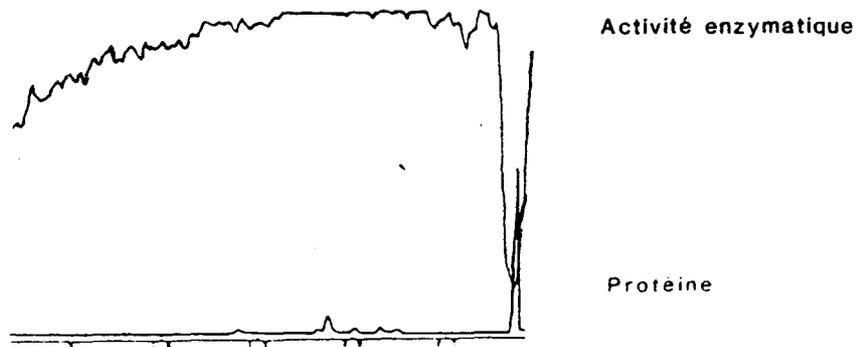
- 1) Fraction F_{III}
- 2) Fraction F_{II} Mono Q 0.6M
- 3) Fraction F_{II} Mono Q 0.1M
- 4) Fraction F_{II} Mono Q 0.375M
- 5) Extrait de traitement aux ultra-sons



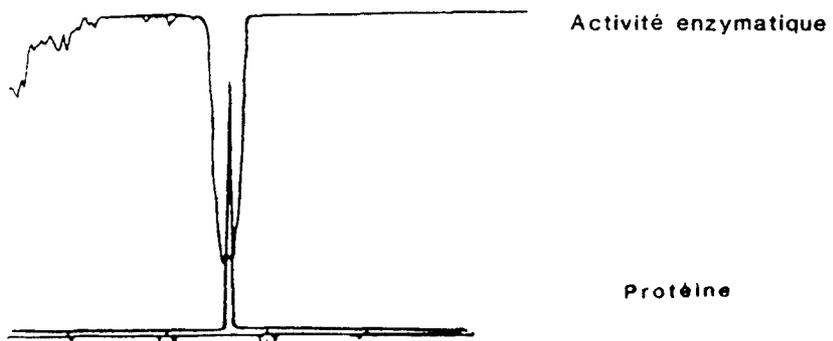
SUPERPOSITION DU PROFIL D'ACTIVITE ET DU PROFIL PROTEIQUE DE LA FRACTION F_{III} AU DENSITOMETRE



SUPERPOSITION DU PROFIL D'ACTIVITE ET DU PROFIL PROTEIQUE DE LA FRACTION F_{II} MONO Q 0,6 M AU DENSITOMETRE



SUPERPOSITION DU PROFIL D'ACTIVITE ET DU PROFIL PROTEIQUE DE LA FRACTION F_{II} MONO Q 0,1 M AU DENSITOMETRE



SUPERPOSITION DU PROFIL D'ACTIVITE ET DU PROFIL PROTEIQUE DE LA FRACTION F_{II} MONO Q 0,375 M AU DENSITOMETRE

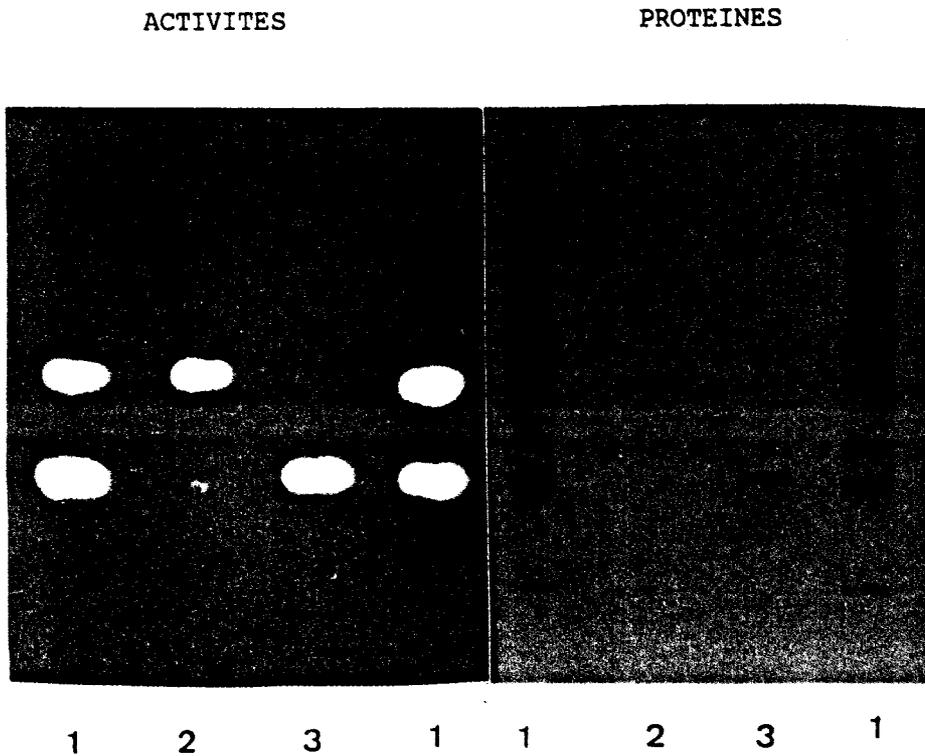
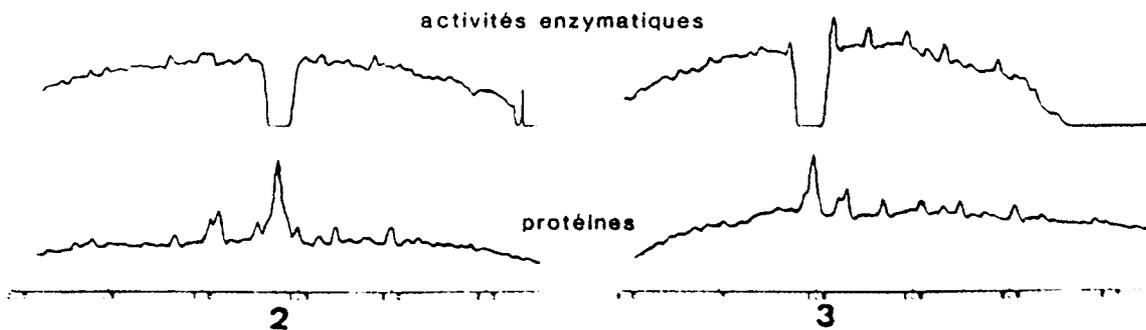


FIGURE 17: REVELATION DES ACTIVITES N-ACETYL- β -D-HEXOSAMINIDASIQUES APRES ELECTROPHORESE EN CONDITIONS NON DENATURANTES

- 1) Extrait de traitement aux ultra-sons
- 2) Fraction F_{II} Mono Q 0.375 M
- 3) Fraction F_{II} Mono Q 0.25 M



SUPERPOSITION DU PROFIL D'ACTIVITE ET DU PROFIL PROTEIQUE DES FRACTIONS F_{II} MONO Q 0,375 M ET F_{II} MONO Q 0,25 M AU DENSITOMETRE (puits 2 et 3)

ACTIVITES

PROTEINES

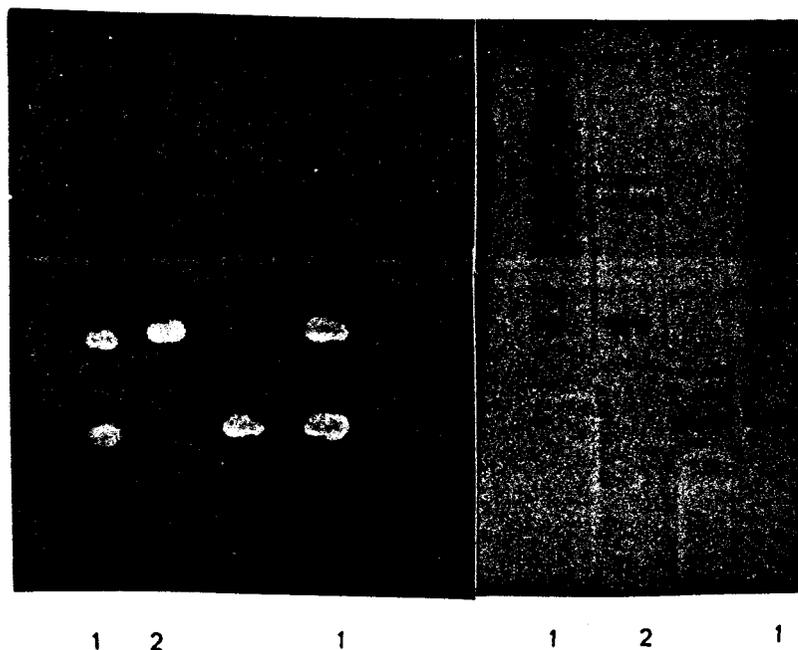
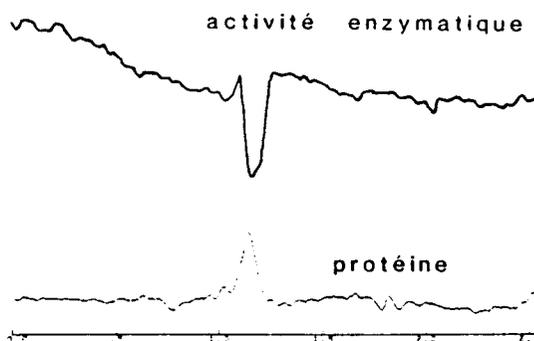


FIGURE 18 : REVELATION DE L'ACTIVITE NEURAMINIDASIQUE APRES ELECTROPHORESE EN CONDITIONS NON DENATURANTES

- 1) Extrait de traitement aux ultra-sons
- 2) Fraction F_{II} Mono Q 0.25 M



SUPERPOSITION DU PROFIL D'ACTIVITE ET DU PROFIL PROTEIQUE DE LA FRACTION F_{II} MONO Q 0,25 M AU DENSITOMETRE

V-DETERMINATION DES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES

A-DETERMINATION DES MASSES MOLECULAIRES

1-RESULTATS :

Ces déterminations ont été réalisées en gel filtration sur superose 6 comme nous l'avons décrit page 52. La figure 19 (p. 94) nous montre la relation linéaire existant entre le coefficient K_{av} dépendant du volume d'élution et le logarithme (\log_{10}) de la masse moléculaire.

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

V_e = Volume d'élution
 V_t = Volume total du gel
 V_o = Volume d'exclusion

Les masses moléculaires apparentes des différentes fractions sont reportées dans le tableau XXI page 96. Il est à noter que pour les fractions F_{11} Mono Q 0,25 M et 0,375 M on retrouve les deux activités exoglycosidasiques de chaque fraction au même volume d'élution.

2-CONCLUSIONS :

- Pour les fractions F_{111} et F_{11} Mono Q 0,6 M possédant chacune une activité exoglycosidasique, nous n'avons obtenu qu'une seule bande en électrophorèse dénaturante, de respectivement 83.000 et 58.000, et une masse moléculaire apparente en gel filtration de 200.000 et 420.000. Ceci indique que nous serions ici également en présence de protéines polycaténaires, mais constituées de la répétitions de monomères identiques.

- Pour la fraction F_{11} Mono Q 0,25 M la masse moléculaire apparente trouvée en gel filtration (97.000) est proche de la somme des masses des deux bandes majeures obtenues en électrophorèse dénaturante (87.000 + 28.000). On aurait donc association de deux monomères différents.

- Pour la fraction F_{11} Mono Q 0,375 M, la masse moléculaire apparente trouvée en gel filtration (170.000) est très inférieure à la somme des

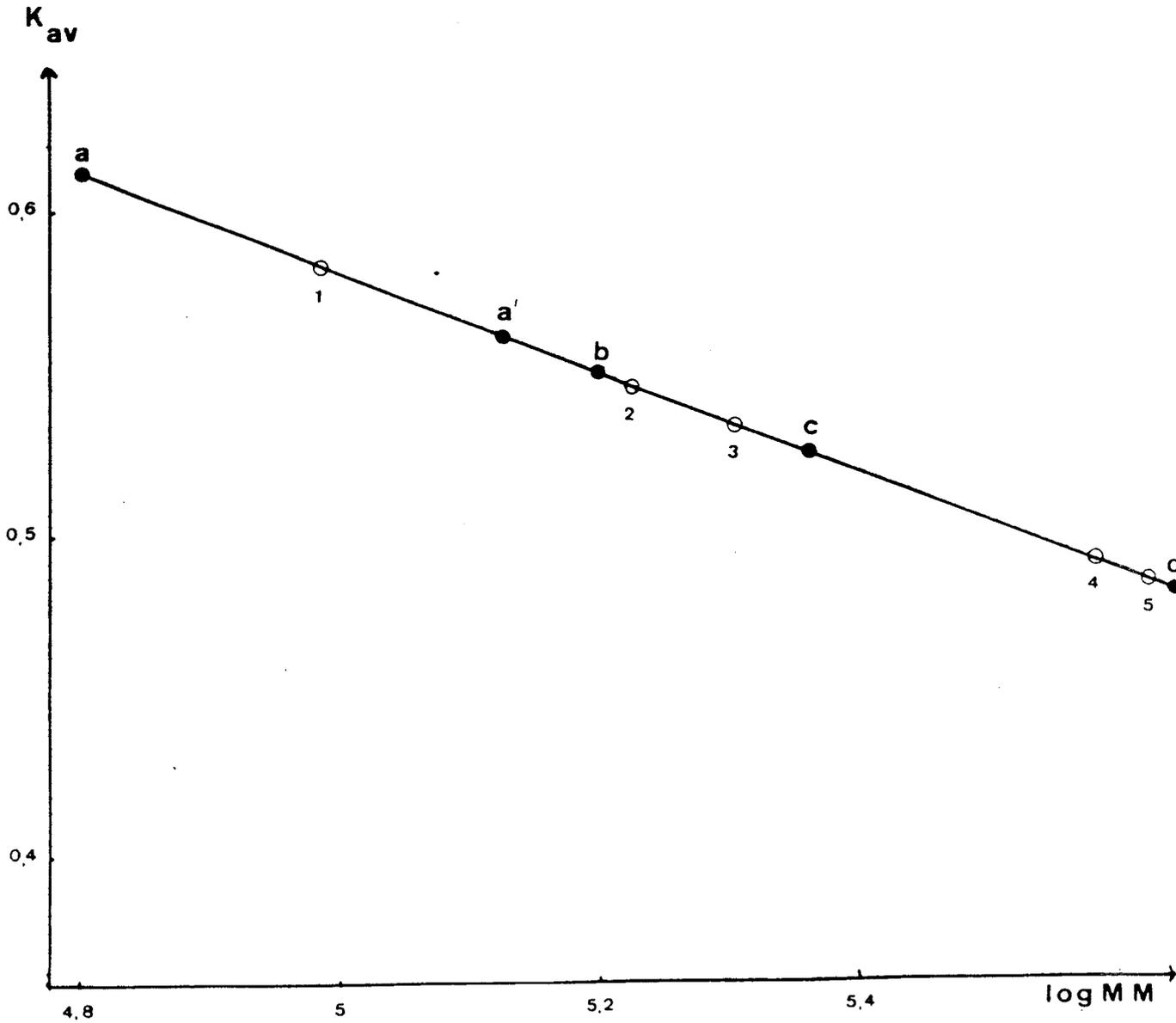


FIGURE 19 - DETERMINATION DES MASSES MOLECULAIRES DES
EXOGLYCOSIDASES DE *BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM* PAR
CHROMATOGRAPHIE DE GEL FILTRATION SUR SUPEROSE 12

| | |
|------------------------------------|---|
| a = Serum albumine bovine monomère | 1 = Fraction F _{II} mono Q 0,25 M |
| a' = Serum albumine bovine dimère | 2 = Fraction F _{II} mono Q 0,375 M |
| b = Aldolase | 3 = Fraction F _{III} |
| c = Catalase | 4 = Fraction F _{II} mono Q 0,1 M |
| d = Ferritine | 5 = Fraction F _{II} mono Q 0,6 M |

quatre bandes obtenues en électrophorèse dénaturante (94.000, 86.000, 63.000 et 50.000 soit une somme de 293.000). Ceci peut être dû soit à une affinité de la protéine pour le support chromatographique utilisé lors de la gel filtration, soit à une structure tridimensionnelle différente de celles des témoins de masse utilisés (B.S.A. : 67.000 et 134.000, Aldolase : 158.000, Catalase : 234.000 et Ferritine : 440.000).

B-DETERMINATION DU POINT ISOÉLECTRIQUE

1-RESULTATS :

Cette étude a été effectuée par chromatofocalisation des différentes fractions purifiées (comme décrit p.53). Les valeurs des différents pHi sont regroupées dans le tableau XXI page 96. Un exemple de profil obtenu et de gradient établi est présenté dans la figure 20 (p. 97). Toutes les fractions possèdent des pHi acides, compris entre 4,0 et 5,1. Cet autre type de chromatographie n'a pas non plus permis de séparer les deux activités présentes conjointement dans certaines des fractions.

2-CONCLUSIONS :

On constate que la fraction F_{II} Mono Q 0,375 M et la fraction F_{III} ont le même pHi (4,0). La migration en électrophorèse en conditions non dénaturantes est dans ce cas liée à la différence de masse moléculaire de ces deux protéines. On constate que la fraction F_{II} Mono Q 0,375 M migre au delà de la fraction F_{III} : ceci confirme le résultat obtenu en gel filtration. La masse moléculaire de la première fraction citée est inférieure à celle de la seconde. La différence de masse moléculaire de la fraction F_{II} Mono Q 0,375 M observée en conditions dénaturantes et non dénaturantes n'est donc pas liée à une affinité de la protéine pour la matrice chromatographique mais à une structure tridimensionnelle différente.

TABLEAU XXI - DETERMINATION DES MASSES MOLECULAIRES PAR
GEL FILTRATION SUR SUPEROSE 12 ET DES pH1 PAR
CHROMATOFOCALISATION

| | MASSES MOLECULAIRES | | pH1 |
|---|---------------------|--------------------------------------|-----|
| | Conditions | Conditions | |
| | Natives | Dénaturantes | |
| Fraction F ₁₁₁ Mono Q 0,1M (Gal ^{***} / Fuc ^{***}) | 385.000 | ND | 5,1 |
| Fraction F ₁₁₁ Mono Q 0,25M (GlcNAc ^{***} / NeuAc ^{***}) | 97.000 | 87.000 28.000 | 4,2 |
| Fraction F ₁₁₁ Mono Q 0,375M (Gal ^{***} / GlcNAc ^{***}) | 170.000 | 94.000 86.000 63.000 50.000 | 4,0 |
| Fraction F ₁₁₁ Mono Q 0,6M (Gal ^{***}) | 420.000 | 58.000 | 4,6 |
| Fraction F ₁₁₁ (Gal ^{***}) | 200.000 | 83.000 | 4,0 |

ND : Non déterminé

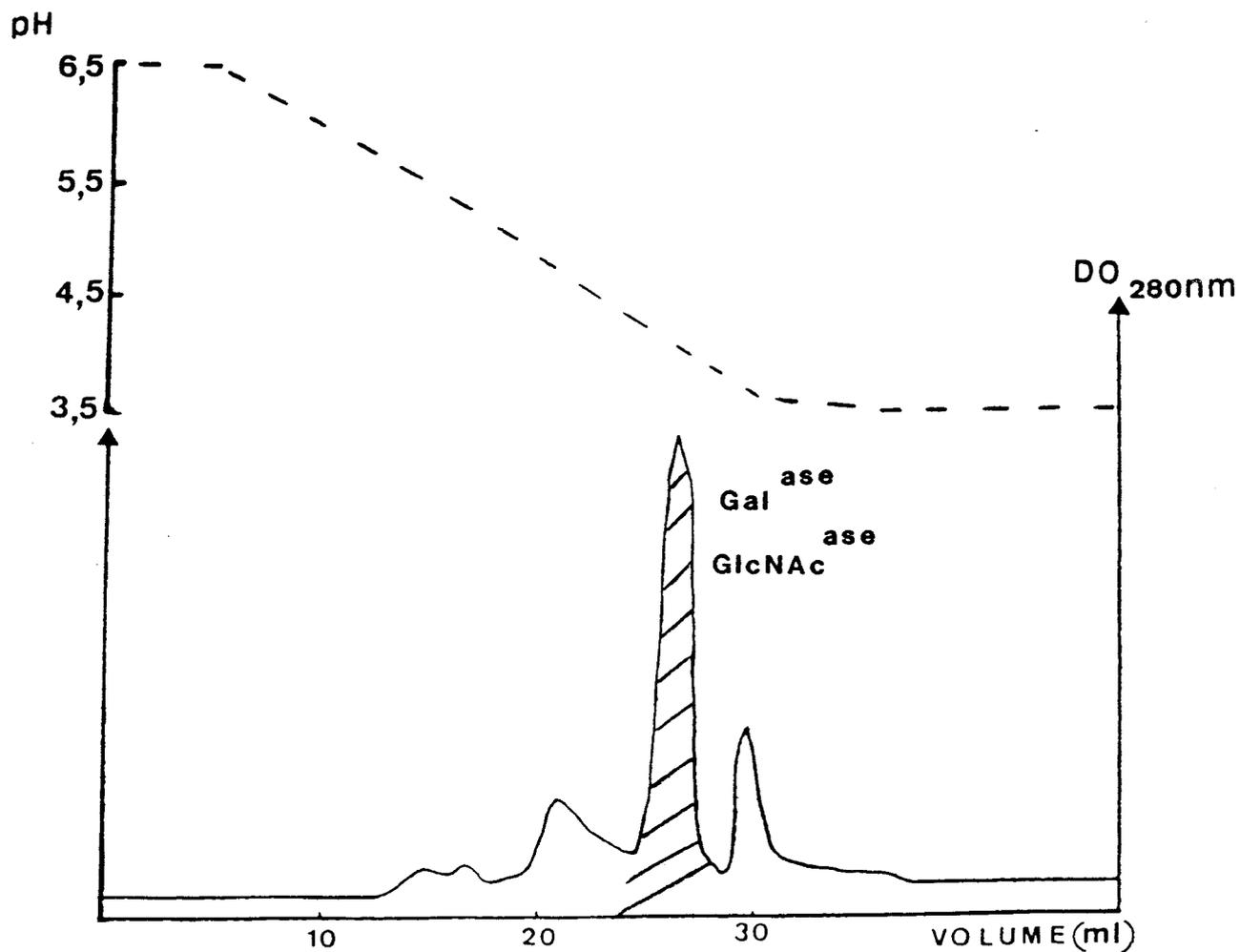


Figure 20: Profil d'élution de la fraction F_{II} Mono Q 0,375 M sur colonne de chromatofocalisation.

La fraction F_{II} Mono Q 0,375 M est injectée sur colonne de chromatofocalisation équilibrée en tampon Tris/Hcl 25 mM pH 6,5. L'élution est réalisée par un gradient de pH décroissant (voir les conditions p.53) et suivie par mesure de la densité optique à 280 nm.

VI-DETERMINATION DES PARAMETRES ENZYMATIQUES

A-DETERMINATION DES pH OPTIMAUX

1-DETERMINATION DES pH OPTIMAUX DES ACTIVITES β -D-GALACTOSIDASIQUES :

Les valeurs trouvées sont regroupées dans le tableau XXII page 100. Trois fractions présentent le même pH optimal. A pH 4, l'activité β -D-galactosidasique est nulle pour les fractions F₁₁ Mono Q 0,375 M et 0,6 M et F₁₁₁; elle est de 5 p.100 pour la fraction F₁₁ Mono Q 0,1 M. A pH 10 aucune des fractions n'est active.

2-DETERMINATION DES pH OPTIMAUX DES ACTIVITES N-ACÉTYL- β -D-HEXOSAMINIDASIQUES :

Les résultats figurent dans le tableau XXIII page 100. Les deux activités N-Acétyle- β -D-hexosaminidasiques ont des pH optimaux distincts de 0,5 unité de pH. A pH 4 la fraction F₁₁ Mono Q 0,25 M a une activité résiduelle de 6 p.100 alors que l'activité est nulle pour la fraction F₁₁ Mono Q 0,375 M. A pH 10 les deux fractions n'ont plus d'activité. On peut remarquer que les deux activités présentes dans la fraction F₁₁ Mono Q 0,375 M possèdent le même pH optimal.

3-DETERMINATION DU pH OPTIMAL DE L'ACTIVITE α -D-NEURAMINIDASIQUE :

Le pH optimal de la fraction F₁₁ Mono Q 0,25 M est de 5,3. A pH 4 l'activité résiduelle est de 11 p.100 et elle est nulle à pH 10. Dans cette fraction les deux activités ont un pH optimal très proche.

4-DETERMINATION DU pH OPTIMAL DE L'ACTIVITE α -L-FUCOSIDASIQUE :

Le pH optimal est de 6. A pH 4 l'activité résiduelle est de 25 p.100. A pH 10 l'activité est nulle. A noter que les deux activités de la fraction (Gal*** et Fuc***) ont le même pH optimal.

B-DETERMINATION DES TEMPERATURES OPTIMALES

Les activités ont été mesurées à différentes températures comprises entre 37 et 55 °C (comme décrit p. 54).

1-DETERMINATION DES TEMPERATURES OPTIMALES DES ACTIVITES β -D-GALACTOSIDASIQUES :

Ces températures sont regroupées dans le tableau XXII page 100 ; elles varient entre 40 et 48 °C.

2-DETERMINATION DES TEMPERATURES OPTIMALES DES ACTIVITES N-ACETYL- β -D-HEXOSAMINIDASIQUES :

Les deux activités N-Acétyle- β -D- hexosaminidasiques étudiées ont une température optimale de 48 °C. Dans la fraction F₁₁ Mono Q 0,375 M les deux activités exoglycosidasiques ont des températures optimales identiques.

3-DETERMINATION DE LA TEMPERATURE OPTIMALE DE L'ACTIVITE α -D-NEURAMINIDASIQUE :

Cette température optimale est de 48 °C. là aussi, on constate que la température optimale est identique pour les deux activités de la fraction F₁₁ Mono Q 0,25 M.

4-DETERMINATION DE LA TEMPERATURE OPTIMALE DE L'ACTIVITE α -L-FUCOSIDASIQUE

La température optimale de cette activité est de 45 °C. Dans la fraction F₁₁ Mono Q 0,1 M les deux activités ont des températures optimales différentes.

**TABLEAU XXII - pH OPTIMAUX ET TEMPERATURES OPTIMALES DES
ACTIVITES β -D-GALACTOSIDASIQUES DE
BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM**

| | pH OPTIMAL | TEMPERATURE OPTIMALE (°C) |
|---|------------|---------------------------|
| Fraction F _{II} Mono Q 0,1M (Gal ^{***} / Fuc ^{***}) | 6,0 | 40 |
| Fraction F _{II} Mono Q 0,375M (Gal ^{***} / GlcNAc ^{***}) | 6,0 | 48 |
| Fraction F _{II} Mono Q 0,6M (Gal ^{***}) | 6,5 | 45 |
| Fraction F _{III} (Gal ^{***}) | 6,0 | 45 |

**TABLEAU XXIII - pH OPTIMAUX ET TEMPERATURES OPTIMALES DES
N-ACETYL- β -D-HEXOSAMINIDASES**

| | pH OPTIMAL | TEMPERATURE OPTIMALE (°C) |
|--|------------|---------------------------|
| Fraction F _{II} Mono Q 0,25M (GlcNAc ^{***} / NeuAc ^{***}) | 5,5 | 48 |
| Fraction F _{II} Mono Q 0,375M (Gal ^{***} / GlcNAc ^{***}) | 6,0 | 48 |

C-DÉTERMINATION DES PARAMÈTRES ENZYMATIQUES K_m ET V_m DES ACTIVITÉS EXO-GLYCOSIDASIQUES

Pour toutes les activités nous sommes en présence d'enzymes de type michaelien classique.

1-DÉTERMINATION DES PARAMÈTRES ENZYMATIQUES DES ACTIVITÉS β -D-GALACTOSIDASIQUES :

a-Détermination des paramètres enzymatiques sur le pNP-Gal et le lactose :

Cette étude a été réalisée sur un substrat synthétique (pNP-Gal) et sur le lactose comme nous l'avons décrit page 54. Les résultats sont rassemblés dans le tableau XXIV p.102. Les points à retenir sont les suivants :

- Le rapport V_m/K_m pour le pNP-Gal est identique pour les fractions F_{II} Mono Q 0,375 M et 0,6 M et pour la fraction F_{III} . La fraction F_{II} Mono Q 0,1 M est la moins affine vis à vis de ce substrat.

- Par contre, au niveau de l'hydrolyse du lactose, il existe trois groupes de réactivités différentes : Ce rapport V_m/K_m est le même pour les fractions F_{II} Mono Q 0,375 M et 0,6 M. qui sont les plus actives, ensuite nous avons la fraction F_{II} Mono Q 0,1 M et enfin la fraction F_{III} qui présente une faible affinité pour ce substrat.

- Dans tous les cas l'affinité vis-à-vis du substrat synthétique est supérieure (K_m inférieur) à celle du lactose. Les fractions F_{II} Mono Q 0,1 M , 0,375 M et 0,6 M sont de quatre à cinq fois plus affine pour le pNP-Gal et la fraction F_{III} quant à elle est 14 fois plus affine pour le substrat synthétique. Les vitesses maximales vis-à-vis du pNP-Gal sont elles aussi supérieures (environ cinq fois).

b>Action des activités β -D-galactosidasiques sur différents substrats

Nous avons fait agir les différentes fractions contenant une activité β -D-galactosidasique sur trois substrats différents : le lactose, le lacto-N-tétraose et le lacto-N-néotétraose, en suivant le protocole décrit page 55. Toutes les β -D-galactosidasiques sont capables d'hydrolyser

TABLEAU XXIV - DETERMINATION DES PARAMETRES CINETIQUES DES
ACTIVITES β -D-GALACTOSIDASIQUES

| | pNP-Galactoside | | Lactose | |
|--|-----------------|-----------------------------|---------------|-----------------------------|
| | K_m (mM) | V_m (μ moles/min) | K_m (mM) | V_m (μ moles/min) |
| Fraction F ₁₁ MonoQ 0,1M (Gal ⁴ / Fuc ⁴) | 2,8 ± 0,2 | 0,05 ± 5.10 ⁻³ | 14 ± 0,9 | 0,0135 ± 5.10 ⁻⁴ |
| Fraction F ₁₁ MonoQ 0,375M (Gal ⁴ / GlcNAc ⁴) | 1,5 ± 0,1 | 0,05 ± 5.10 ⁻³ | 6,4 ± 0,1 | 0,009 ± 3.10 ⁻⁴ |
| Fraction F ₁₁ MonoQ 0,6M (Gal ⁴) | 1,6 ± 0,1 | 0,05 ± 5.10 ⁻³ | 8,1 ± 0,4 | 0,012 ± 2.10 ⁻⁴ |
| Fraction F ₁₁₁ (Gal ⁴) | 2,2 ± 0,2 | 0,07 ± 7.10 ⁻³ | 31 ± 1 | 0,01 ± 2.10 ⁻⁴ |

ces trois substrats mais avec des réactivités différentes :

- la Fraction F_{11} Mono Q 0,1 M (Gal^{***}-Fuc^{***}) et la Fraction F_{11} mono Q 0,375 M (Gal^{***}-GlcNAc^{***}) libèrent chacune la même quantité de galactose pour les trois substrats : respectivement 15 μ g et 20 μ g de monosaccharide libéré.
- la Fraction F_{111} libère plus de galactose (15 μ g) avec le lacto-N-tétraose qu'avec le lactose et le lacto-N-néotétraose, pour lesquels nous avons une libération de 7 μ g de galactose. Cette enzyme serait donc plus active sur les liaisons β 1,3 que sur les liaisons β 1,4.
- la Fraction F_{11} Mono Q 0,6 M hydrolyse la totalité du lactose (libération de 36 μ g de galactose) mais agit très faiblement sur les deux autres substrats étudiés, pour lesquels nous n'avons que 2 μ g de galactose libéré. Cette enzyme a donc plutôt le comportement d'une lactase.

2-DETERMINATION DES PARAMETRES ENZYMATIQUES DES ACTIVITES β -D-HEXOSAMINIDASIQUES :

Ces paramètres ont été déterminés sur un substrat synthétique (pNP-GlcNAc) selon le protocole décrit page 55.

Les résultats obtenus sont les suivants :

- Fraction F_{11} Mono Q 0,250 M : $K_m = 4,6 \pm 0,025$ mM
 $V_m = 0,105 \pm 5 \cdot 10^{-3}$ μ moles.min⁻¹
- Fraction F_{11} Mono Q 0,375 M : $K_m = 2,4 \pm 0,100$ mM
 $V_m = 0,090 \pm 5 \cdot 10^{-3}$ μ moles.min⁻¹

La fraction F_{11} Mono Q 0,375 M est deux fois plus affine pour ce substrat que la fraction F_{11} Mono Q 0,25 M. Les vitesses maximales sont très proches.

3-DETERMINATION DES PARAMETRES ENZYMATIQUES DE L'ACTIVITE α -D-NEURAMINI-DASIQUE :

Les valeurs ont été déterminées sur substrat synthétique, le méthylumbelliféryl-acide neuraminique (comme décrit p. 55). Les résultats obtenus sont les suivants :

$$K_m = 0,16 \pm 0,2 \text{ mM} \quad V_m = 0,032 \pm 2 \cdot 10^{-3} \text{ } \mu\text{moles.min}^{-1}$$

L'affinité de l'enzyme pour ce substrat est importante, par contre la vitesse maximale est faible.

Nous avons également essayé de voir sur quel type de liaison pouvait agir cette enzyme. Pour cela, nous avons réalisé des cinétiques d'action sur le sialyl (α 2,3) lactose, le sialyl (α 2,6) lactose et l'acide colominique (liaison α 2,8) selon le protocole décrit page 56. Les résultats obtenus sont représentés sur la figure 21 (p. 105). L'enzyme s'avère capable d'hydrolyser les trois types de liaisons; c'est le sialyl (α 2,3) lactose qui est le plus rapidement hydrolysé, puis le sialyl (α 2,6) lactose. Il faut plus de 6 heures d'incubation pour voir débiter une hydrolyse de l'acide colominique. Ces paramètres sont similaires à ceux obtenus avec l'activité α -D-neuraminidase de la fraction F₁.

4-DETERMINATION DES PARAMETRES ENZYMATIQUES DE L'ACTIVITE α -L-FUCOSIDASIQUE

La substance H a été utilisée comme substrat pour cette étude, suivant le protocole décrit page 49.

Le K_m obtenu est de 2,4 \pm 0,3 mM et le V_m de 0,025 \pm 1.10⁻³ μ moles.min.⁻¹. Cette enzyme est capable d'hydrolyser les liaisons α 1,2 et α 1,3 mais il n'a pas été possible de mettre en évidence une activité vis-à-vis de substrats possédant une liaison α 1,6, ce résultat a été obtenu au cours du DEA (LEROUGE, 1984).

D-ACTION DE DIFFERENTS EFFECTEURS SUR LES ACTIVITES EXOGLYCOSIDASQUES ETUDIÉES

Cette étude a été menée selon le protocole décrit page 56. Les résultats sont rassemblés dans les tableaux XXV et XXVI (p. 106).

On remarque que les différents métaux testés ainsi que l'EDTA (à une concentration finale de 2 mM pour chacun d'entre eux) n'ont aucun effet sur les activités N-Acétyle- β -D-hexosaminidasiques, sur l'activité α -D-neuraminidase et sur l'activité α -L-fucosidase. Par contre, les résultats obtenus sur les activités β -D-galactosidasiques sont intéressants : en effet, la β -D-galactosidase de la fraction F₁₁ Mono Q 0,1 M se distingue des autres activités β -D-galactosidasiques, elle est

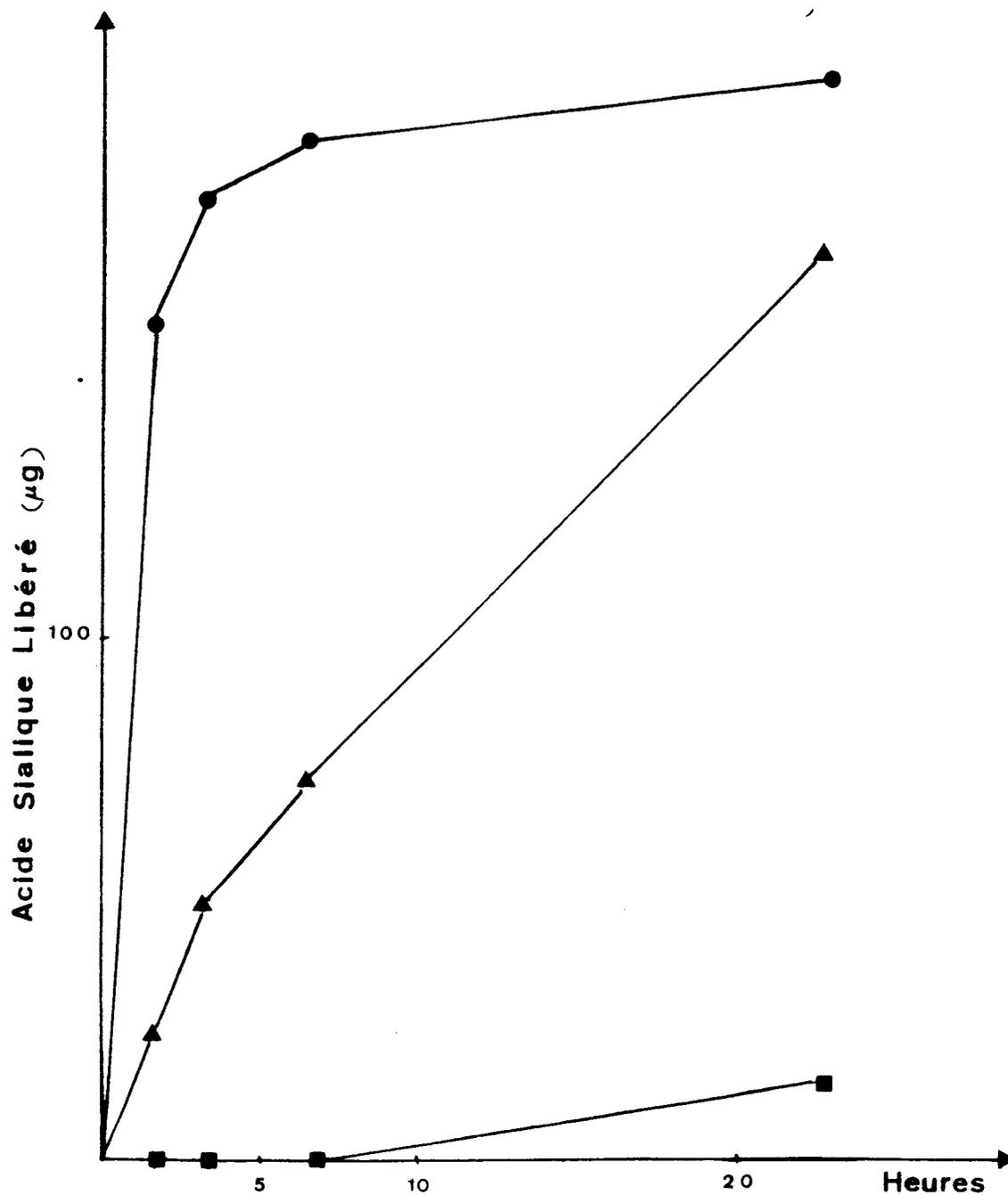


Figure 21 - CINÉTIQUE D'HYDROLYSE DE DIFFÉRENTS SUBSTRATS PAR
L' α -D-NEURAMINIDASE DE LA FRACTION F₁₁ MONO Q 0,25 M

- = Cinétique d'hydrolyse du sialyl 2,3 lactose
- ▲ = Cinétique d'hydrolyse du sialyl 2,6 lactose
- = Cinétique d'hydrolyse de l'acide colominique

**TABEAU XXV - ACTION DE DIFFERENTS EFFECTEURS SUR LES
ACTIVITES β -D-GALACTOSIDASIQUES**

| | Fraction F _{II} Mono Q 0,1M | Fraction F _{II} Mono Q 0,375M | Fraction F _{II} Mono Q 0,6M | Fraction F _{III} |
|-------------------|---|---|---|---------------------------|
| Témoin | 100 | 100 | 100 | 100 |
| CaCl ₂ | 180 | 110 | 100 | 100 |
| CoCl ₂ | 130 | 110 | 150 | 100 |
| MnCl ₂ | 160 | 125 | 130 | 100 |
| MgCl ₂ | 95 | 90 | 100 | 105 |
| EDTA | 20 | 130 | 125 | 140 |
| EGTA | 25 | 120 | 120 | 100 |

**TABEAU XXVI - ACTION DE DIFFERENTS EFFECTEURS SUR LES AUTRES
ACTIVITES EXOGLYCOSIDASIQUES ETUDIÉES**

| | N-Acétyle- β -D-hexosaminidase | | α -D-Neuraminidase | | α -L-Fucosidase | |
|-------------------|--|---|--|--|---|---|
| | Fraction F _{II} Mono Q 0,25M | Fraction F _{II} Mono Q 0,375M | Fraction F _{II} Mono Q 0,25M | Fraction F _{II} Mono Q 0,25M | Fraction F _{II} Mono Q 0,1M | Fraction F _{II} Mono Q 0,1M |
| Témoin | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| CaCl ₂ | 120 | 90 | 100 | 100 | 95 | 95 |
| CoCl ₂ | 100 | 90 | 95 | 95 | 95 | 95 |
| MnCl ₂ | 100 | 95 | 70 | 70 | 100 | 100 |
| MgCl ₂ | 100 | 95 | 90 | 90 | 100 | 100 |
| EDTA | 100 | 95 | 100 | 100 | 95 | 95 |

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité par rapport au témoin sans EDTA ni métal.

inhibée par l'EDTA et l'EGTA. De plus, elle est activée par le calcium et le manganèse. La β -D-galactosidase de la fraction F_{III} est sensible à l'oxydation catalysée par les métaux, en effet elle est activée par l'EDTA, comme celles des fractions F_{II} Mono Q 0,375 M et 0,6 M. Ces deux dernières fractions sont également activées par le manganèse. Enfin, la β -D-galactosidase de la fraction F_{II} Mono Q 0,6 M se distingue par l'effet activateur du cobalt.

Pour l'activité galactosidasique de la fraction F_{II} Mono Q 0,1 M, l'effet inhibiteur de l'EDTA s'est révélé identique pour des concentrations allant de 0,1 mM à 2 mM.

Nous avons essayé de lever cette inhibition due à l'EDTA (0,1 mM) en faisant agir différents métaux testés précédemment. Les résultats sont rassemblés dans le tableau XXVII page 108. L'adjonction de calcium, de cobalt et de manganèse à partir d'une concentration finale égale à celle de l'EDTA présent permettent de restaurer l'activité initiale. Au dessus de cette concentration on retrouve l'effet d'activation de ces différents métaux. L'adjonction de magnésium ne permet pas de récupérer l'activité initiale, même pour une concentration 10 fois supérieure à celle de l'EDTA présent.

E-ACTION DE LA FRACTION F_{II} MONO Q 0,375 M SUR DEUX TYPES DE SUBSTRATS :

Nous avons voulu savoir si les deux activités présentes dans la Fraction F_{II} mono Q 0,375 M (Gal^{***}-GlcNac^{***}) sont portées ou non par un même site. Pour cela nous avons incubé la fraction enzymatique en présence de deux substrats : le pNP-Gal et le pNP-GlcNac (comme décrit p. 56). Si les deux sites sont différents, la somme des deux activités obtenue avec l'hydrolyse séparée de ces deux substrats doit être égale à l'activité obtenu en présence des deux mêmes substrats aux mêmes concentrations.

Les résultats obtenus sont :

- pour le pNP-Gal : 0,25 μ moles hydrolysées pour 10 minutes d'incubation,
- pour le pNP-GlcNac : 0,25 μ moles hydrolysées pour 10 minutes d'incubation,
- somme théorique : 0,50 μ moles hydrolysées,
- valeur expérimentale : 0,35 μ moles.

La différence significative observée entre la valeur théorique et la valeur expérimentale prouve qu'il y a soit une interaction entre les deux sites d'hydrolyse, soit présence d'un seul site commun aux deux

TABLEAU XXVII - ACTION DE DIFFERENTS METAUX SUR L'ACTIVITE GALACTOSIDASIQUE DE LA FRACTION FII MONO Q 0,1 M EN PRESENCE D'EDTA 0,1 mM

| | CaCl ₂ | CoCl ₂ | MnCl ₂ | MgCl ₂ |
|----------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Témoin sans EDTA ni métal | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Témoin (EDTA 0,1 mM) | 20 | 20 | 20 | 22 |
| EDTA 0,1 mM + Métal 0,1 mM | 110 | 100 | 100 | 28 |
| EDTA 0,1 mM + Métal 0,5 mM | 150 | 120 | 140 | 46 |
| EDTA 0,1 mM + Métal 1 mM | 150 | 130 | 160 | 60 |

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité par rapport au témoin sans EDTA ni métal.

activités

Nous avons poursuivi l'expérience afin de voir s'il n'y avait effectivement qu'un seul site pour les deux activités. Pour cela nous avons inhibé l'activité Gal^{***} par du galactose libre dans le milieu de réaction, et nous avons regardé l'effet de cette inhibition sur l'activité GlcNAc^{***}. Nous avons fait de même pour l'activité GlcNAc^{***} par adjonction de N acétylglucosamine libre, et nous avons regardé l'effet sur l'activité Gal^{***}. Les résultats sont rassemblés dans les tableaux XXVIII et XXIX page 110.

On constate que le galactose libre inhibe la Gal^{***}, mais n'a aucun effet sur la GlcNAc^{***}. De même la N-acétylglucosamine inhibe la GlcNAc^{***} mais n'a pas d'effet sur la Gal^{***}. Nous avons donc bien deux sites différents; le fait de ne pas obtenir la somme théorique lors de l'action de la fraction enzymatique sur le mélange de substrats synthétiques pourrait être dû à la proximité des deux sites. L'accès à un site serait donc gêner par l'encombrement dû à la présence du substrat fixé sur le site voisin ou lié à l'existence d'un site de fixation hydrophobe qui permettrait de fixer le pNitrophénol.

Nous avons donc regardé l'action du pNitrophénol (0,16 mM final) sur la réactivité des deux enzymes. Celui-ci n'a aucun effet sur la β -D-galactosidase et sur la N-acétyl- β -D-hexosaminidase. Il faut donc écarter l'hypothèse de la présence d'un site hydrophobe reconnaissant le pNitrophénol.

F- CONCLUSIONS

Les deux activités β -D-galactosidasiques des fractions F₁₁ Mono Q 0,6 M et F₁₁₁ diffèrent par de nombreux points :

- Leur comportement chromatographique n'est pas semblable,
- leurs masses moléculaires apparentes en électrophorèse en présence de SDS et de β -mercaptoéthanol sont différentes,
- leurs masses moléculaires apparentes en gel-filtration sur Superose 12 sont également différentes,
- leurs points isoélectriques, bien que tous deux acides, sont distincts de 0,6 unités de pH,
- 0,5 unités de pH séparent leurs pH optimaux,
- l'activité β -D-galactosidasique de la fraction F₁₁ Mono Q 0,6 M est plus affine pour le substrat synthétique (pNP-Gal) et surtout pour le lactose

TABEAU XXVIII : ACTION DU GALACTOSE LIBRE SUR LES ACTIVITES Gal⁻⁻⁻ ET GlcNAc⁻⁻⁻ DE LA FRACTION F₁₁ MONO Q 0,375 M

| ACTIVITE | VITESSE D'HYDROLYSE POUR UNE CONCENTRATION FINALE EN GALACTOSE (mM) DE | | | | |
|-----------------------|---|------|------|------|------|
| | 0 | 25 | 50 | 100 | 200 |
| Gal ⁻⁻⁻ | 0,25 | 0,24 | 0,23 | 0,21 | 0,17 |
| GlcNAc ⁻⁻⁻ | 0,25 | 0,24 | 0,24 | 0,24 | 0,24 |

TABEAU XXIX : ACTION DE LA N ACETYLGLUCOSAMINE SUR LES ACTIVITES Gal⁻⁻⁻ ET GlcNAc⁻⁻⁻ DE LA FRACTION F₁₁ MONO Q 0,375 M

| ACTIVITE | VITESSE D'HYDROLYSE POUR UNE CONCENTRATION FINALE EN GlcNAc (mM) DE | | | | |
|-----------------------|--|------|------|------|------|
| | 0 | 25 | 50 | 100 | 200 |
| Gal ⁻⁻⁻ | 0,25 | 0,24 | 0,24 | 0,24 | 0,23 |
| GlcNAc ⁻⁻⁻ | 0,24 | 0,21 | 0,18 | 0,14 | 0,11 |

Les activités sont exprimées en µmoles de substrat hydrolysé pour 10 minutes.

que celle de la fraction F_{III}.

Nous pouvons donc conclure que nous avons chez *Bifidobacterium bifidum* au moins deux β -D-galactosidases différentes tant au point de vue de la molécule que de leur activité enzymatique.

Les autres fractions purifiées comportent chacune deux activités exoglycosidasiques. On retrouve dans ces fractions deux activités β -D-galactosidasiques, deux activités N-acétyl- β -D-hexosaminidasiques, une activité α -D-neuraminidasique et une activité α -L-fucosidasique.

Les deux activités β -D-galactosidasiques copurifiées avec une autre activité exoglycosidasique ont des paramètres physico-chimiques et enzymatiques différents, mais la présence de la seconde activité a pu influencer sur l'étude de ces paramètres. Ceci a été partiellement démontré en effectuant l'expérience d'hydrolyse simultanée de deux différents substrats par la fraction F_{II} Mono Q 0,375 M. Nous ne pouvons donc établir si ces deux β -D-galactosidases sont différentes entre-elles, et différentes des deux premières citées. Cependant, l'activité β -D-galactosidasique de la fraction F_{II} Mono Q 0,1 M est la seule à être inhibée par l'EDTA et activée par le calcium. L'activité α -L-fucosidasique copurifiée avec elle n'est pas sensible à ces éléments. L'action de ces effecteurs indique que cette activité serait différente des deux β -D-galactosidases purifiées dans les fractions F_{II} Mono Q 0,6 M et F_{III}. Ainsi *Bifidobacterium bifidum* posséderait au moins trois β -D-galactosidases différentes.

Les deux activités N-acétyl- β -D-glucosaminidasiques ont des pH optimaux, des p*H*_i, des masses moléculaires et des affinités vis-à-vis du pNP-GlcNAc différents. Mais ici aussi les résultats peuvent être dus à la présence de la seconde activité.

CONCLUSION GENERALE

Nos travaux s'inscrivent dans la thématique du Laboratoire concernant l'étude des composés biologiquement actifs du lait de Femme. Certains travaux réalisés antérieurement concernent le rôle du lait maternel dans la protection du tractus digestif contre les infections. Cet effet de résistance accru est également lié à la présence de *Bifodobacterium bifidum*. Nous avons voulu approfondir nos connaissances au sujet de cette bactérie, et plus particulièrement connaître son potentiel enzymatique, plus spécifiquement les exoglycosidases pouvant intervenir dans la libération des facteurs bifidigènes BF 1.

Au terme de notre exposé il nous est possible de dégager les points suivants :

Les activités exoglycosidasiques ne sont pas excrétées dans le milieu, elles sont à notre avis endocellulaires. Elles peuvent être soit intra-cellulaires, soit intégrées au système membranaire. Le caractère hydrophobe des protéines isolées et les conditions drastiques qu'il nous a fallu employer pour les extraire nous donnent à penser que ces enzymes sont associées aux membranes.

Le protocole de purification que nous avons établi nous a permis d'obtenir six fractions :

- F_I (NeuAc^{***})
- F_{II} Mono Q 0,1 M (Gal^{***} + Fuc^{***})
- F_{II} Mono Q 0,25 M (GlcNAc^{***} + NeuAc^{***})
- F_{II} Mono Q 0,375 M (Gal^{***} + GlcNAc^{***})
- F_{II} Mono Q 0,6 M (Gal^{***})
- F_{III} (Gal^{***}).

La première étape est réalisée sur Hydroxylapatite Ultrogel. Elle permet d'obtenir 3 fractions : F_I (Neu^{***}) étudiée plus en détail par E. BOUTRY, F_{II} contenant les 4 activités étudiées, F_{III} (Gal^{***})

La deuxième étape sur chromatographie d'échanges d'ions Mono Q donne les 6 fractions précédemment citées. Enfin, le dernière étape sur Octyl sépharose améliore la pureté de ces différentes fractions. Dans la fraction F_{II} Mono Q 0,1 M, la β -D-galactosidase est purifiée 3 fois et l' α -L-fucosidase 55 fois. Dans la fraction F_{II} Mono Q 0,25 M le facteur de

purification est de 3 pour la N-acétyl- β -D-hexosaminidase et de 0,1 pour l' α -D-neuraminidase. Dans la fraction F_{II} Mono Q 0,375 M, la β -D-galactosidase est purifiée 3 fois et la N-acétyl- β -D-hexosaminidase 1,3 fois. Les β -D-galactosidases des fractions F_{II} Mono Q 0,6 M et F_{III} ont des taux de purification respectifs de 200 et 400. Il ne nous a pas été possible de séparer les deux activités présentes dans certaines fractions.

Les électrophorèses en conditions dénaturantes ont donné deux fractions avec une bande unique. Il s'agit des fractions F_{II} Mono Q 0,6 M et F_{III} avec des masses de 58000 et de 83000. Pour la fraction F_{II} 0,25 M on obtient deux bandes majeures de masse moléculaires 87000 et 28000 et pour la fraction 0,375 M, 4 bandes de masses 94000, 86000, 63000 et 50000.

Les électrophorèses en conditions non dénaturantes n'ont mis en évidence qu'une seule bande protéique par fraction, il a été démontré que chaque bande correspondait bien à l'activité ou aux deux activités concernées.

Nous avons ensuite déterminé les masses moléculaires des différentes fractions en gel filtration sur superose 6. Ces masses sont de 400000 (F_{II} Mono Q 0,1 M), 97000 (F_{II} Mono Q 0,25 M), 170000 (F_{II} Mono Q 0,375 M), 420000 (F_{II} Mono Q 0,6 M), 200000 (F_{III}). Les pHi obtenus par chromatofocalisation sont acides et compris entre 4 et 5,1

Quelques paramètres enzymatiques ont été étudiés. Trois β -D-galactosidases ont le même pH optimal d'action de 6, celui de la β -D-galactosidase de la fraction F_{II} 0,6 M est de 6,5. Leurs températures optimales sont comprises entre 40°C et 48°C. Les deux activités N-acétyl- β -D-hexosaminidasiques ont la même température optimale : 48°C. Les pH optimaux sont de 5,5 (F_{II} Mono Q 0,25 M) et 6 (F_{II} Mono Q 0,375 M). La température optimale de l' α -D-neuraminidase est de 48°C et le pH optimal de 5,3. L' α -L-fucosidase a une température optimale de 45°C et un pH de 6. Le rapport V_m/K_m pour le pNP-gal est identique pour trois fractions, la fraction F_{II} Mono Q 0,1 M est elle la moins active. Pour le lactose, il y a trois groupes. Les fractions F_{II} Mono Q 0,1 M et 0,375 M sont les plus affines, la fraction F_{III} est quant à elle la moins affine. Les fractions F_{II} 0,375 M et 0,6 M hydrolysent avec la même vitesse les liaisons β 1,3 et β 1,4. La fraction F_{III} hydrolyse plus rapidement les liaisons β 1,3 et la fraction F_{II} Mono Q 0,6 M a plutôt le comportement d'une lactase. Les K_m

des N-acétyl- β -D-hexosaminidases sur le pNP-glcNAc sont de 4,6 mM et 2,4mM. Le K_m de l' α -D-neuraminidase sur le MU-NeuAc est de 0,16 mM, elle est capable d'hydrolyser les liaisons α 2,3, α 2,6 et α 2,8. Le K_m de l' α -L-fucosidase est de 2,4 mM, elle hydrolyse les liaisons α 1,2 et α 1,3 mais pas les α 1,6.

Les effecteurs étudiés n'ont eu d'action que sur une activité : la β -D-galactosidase de la fraction F₁₁ Mono Q 0,1 M. Celle-ci est inhibée par l'EDTA et l'EGTA et est activée par la calcium et le magnésium.

Tout ceci nous a permis de démontrer que *Bifidobacterium bifidum* possède trois β -galactosidases différentes, en particulier du point de vue de leur réactivité enzymatique, mais nous ne pouvons conclure au sujet des deux activités N-acétyl- β -D-hexosaminidasiques.

Nous n'avons pas démontré qu'il existait effectivement des complexes enzymatiques. Cependant, nous avons prouvé pour la fraction F₁₁ Mono Q 0,375 M que les deux sites étaient proches et que la réactivité d'une activité influençait celle de l'autre.

Ces résultats sont fragmentaires car nous avons d'abord voulu déterminer un inventaire des potentialités enzymatiques de *Bifidobacterium bifidum*.

Un travail plus approfondi devra être entrepris. Il faudra reprendre la purification de chaque fraction et vérifier l'hypothèse de complexes enzymatiques. Pour cela, il faudra trouver les conditions de dissociation et de séparation des enzymes. Ces complexes enzymatiques ne sont pas entièrement hypothétiques, ils ont déjà été mis en évidence. En particulier le complexe β -D-galactosidase/ α -D-neuraminidase a été démontré dans les testicules de Porc (YAMAMOTO et NISHIMURA, 1986) ainsi que dans les testicules de Taureau et dans le placenta humain (VERHEIJEN *et al.*, 1982 et 1985). Des études plus poussées des enzymes de *Bifidobacterium bifidum*, nous permettrons peut être de mieux comprendre les relations entre la bactérie et les facteurs bifidigènes ainsi que les interactions de celle-ci avec l'hôte. Les enzymes plus purifiées pourront être utilisées comme "outil" dans l'étude des glycoconjugués, afin de confirmer les structures mises en évidence par spectrométrie de masse et par résonance magnétique nucléaire.

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).

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, B., 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. Nutrit., 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

M Schr. 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, N.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, W.M., 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

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

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

CORTHER, 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

DÜSTERWALD, W., KASTNER, W., MÜLLER, H., 1950

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

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

FINCH, P.R., YUEN, R., SCHACHTER, H., MOSCARIELLO, 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 INTOSH, 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., RUELIUS, H.W., ZILLIKEN, F., 1954

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

Bifidus factor IV : preparations obtained from human milk.

GERSTLEY, J.R., HOWELL, K.N., 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. *Fenn* produced by cell-wall precursor

GONCHAROVA, G.I., SEMENOVA, L.P., KOZLOVA, E.P., LIANNIOIA, 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

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., NORRIS, 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

HAENEL, 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., IMAGAWA, 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., MOSSEL, 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*

HOOVER, J.R.E., BRAUN, G.A., GYORGY, P., 1953

Arch. Biochem. Biophys., 47, 216

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., NIKOLAJCIK, 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, N., 1949

österr. Z. Kinderheilk, 3, 55

KOBATA, A., 1977

In "Glycoconjugates", vol. I, p. 423-440, eds HOROWITZ, M.I. et PIGMAN, W. Academic press, New York, London.

KOBATA, A., YAMASHITA, K., TACHIBANA, Y., 1978

Method. Enzymol., 50, 216-220

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*

KHUN, R., 1958

Bull. Soc. Chim. Biol., 40, 297-314

Les oligosaccharides du lait.

KHUN, R., 1959

In "Carbohydrate chemistry of substances of biological interest", vol. 1, p.67, ed WOLFORM, M.L., Pergamon press.

KHUN, R., BAER, H.H., 1956

Chem. Ber., 89, 504

KHUN, R., BROSSMER, R., 1956

Chem. Ber., 89, 2471

KHUN, R., GAUHE, H., 1962

Chem. Ber., 95, 513-517

KHUN, R., GAUHE, H., 1965

Chem. Ber., 98, 395-413

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*

LEROUGE, L., 1984

DEA de biochimie de l'USTL Flandres-Artois

Etude de l' α -L-fucosidase de *bifidobacterium bifidum*

LEVESQUE, J., 1959

Sem. Hôp. Paris, 35, 237-239,

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

LINEVAVER, 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

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., EWALDI, O., 1978

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

Amino acids produced by Bifidobacteria and some Clostridia

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

MONTREVIL, J., 1956

C. R. Hebd. Seances Acad. Sci., 242, 192-197

MOREAU, 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.

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

Pediatric, 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., NIZON, 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 colostral 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*

MORRIS, 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 Säuglings.

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).

POCH, M., BEZKOROVAINY, 1988

J. Dairy Sci., 71, 3214-3221

Growth enhancing supplement for various species of the genus
Bifidobacterium

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.

RAYNAUD, 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., MEUT, C., MONTEVIL, 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., 42, 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 prokaryotes", 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., SGOBATTI, B., 1974**
J. Microbiol. Serol., 40 (3), 427-440
Electrophoretic types of transaldolase, transketolase and other enzymes in *Bifidobacteria*
- SCARDOVI, V., SGOBATTI, 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*

SCHÖNFELD, H., 1926

Jb. Kinderheilk., 113, 19

über die Beziehungen der einzelnen Bestandteile der Frauenmilch zur Bifidusflora.

SEKA ASSY, M., 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., LEMAZ, 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

TAWAKA, R., TAKAYAMA, H., MOROVOMI, M., KUROSHIMA, 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 of sulfhydryl reagents and metal chelators

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*

VERHEIJEN, F., BROSSMER, R., GALJAARD, H., 1982

Biochem. Biophys. Res. Comm., 108, 868-875

Purification of acid β -galactosidase and acid neuraminidase from bovine testis: evidence for an enzyme complex

VERHEIJEN, F., PALMERI, S., HOOGEVEEN, A.T., GALJAARD, H., 1985

Eur. J. Biochem., 149, 315-321

Human placental neuraminidase, activation, stabilization and association with β -galactosidase and its "protective" protein

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 determination 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*

YAMAMOTO, Y., NISHIMURA, K., 1987

Int. J. Biochem., 19, 435-442

Copurification and separation of β -galactosidase and sialidase from porcine testis

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., ISOKINA, 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*

ZILLIKEN, F., BRAUN, G.A., GYORGY, P., 1956

J. Biol. Chem., 63, 394

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

Quatre activités exoglycosidasiqes de Bifidobacterium bifidum souche AA/22 ont été étudiées. Il s'agit des activités: bêta-galactosidase, N-acétyl-bêta-hexosaminidase, alpha-neuraminidase et alpha-fucosidase. Ces activités sont endo-cellulaires, leur extraction est réalisée par ultra-sons. Le schéma de purification suivi nous a permis d'obtenir six fractions. Trois fractions ne contenant qu'une seule activité: une alpha-neuraminidase et deux bêta-galactosidases. Trois fractions possèdent chacune deux activités: une bêta-galactosidase et une alpha-fucosidase; une alpha-neuraminidase et une N-acétyl-bêta-hexosaminidase; une bêta-galactosidase et une N-acétyl-bêta-hexosaminidase. Toutes ces fractions ne révèlent qu'une seule bande en électrophorèse non dénaturante. Nous avons vérifié que celles-ci correspondaient bien aux activités suivies. Les deux activités bêta-galactosidase purifiées séparément sont homogènes en électrophorèse dénaturante. Toutes ces activités ont des températures optimales comprises entre 40 et 48°C. Les pH optimaux sont compris entre 5 et 6.5 et les masses moléculaires relatives déterminées en gel filtration sur Superose 6 varient de 97 000 à 420 000. Les pHi sont acides (4 à 5.1). Seule une activité bêta-galactosidase est sensible à l'EDTA et à l'EGTA, de plus elle est activée par le calcium et le magnésium. Les paramètres enzymatiques des bêta-galactosidases ont été réalisés sur le pNP-Gal et sur le lactose, ils mettent en évidence trois groupes de réactivité différente. Tous ces paramètres nous permettent de conclure que Bifidobacterium bifidum souche AA/22 possède au moins trois bêta-galactosidases différentes. Nous n'avons pas prouvé que dans les fractions contenant deux activités, nous étions en présence d'un complexe enzymatique. Mais nous avons montré que la présence d'une activité influençait la réactivité de l'autre activité présente.

