

N° d'ordre :

Université des Sciences et Technologies de Lille

# Thèse

présentée par

**Isabelle FONTAINE**

pour l'obtention du grade de

**Docteur de l'Université**

Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

## **Bifidobactéries et muqueuse intestinale : contribution à l'étude du mécanisme d'adhérence**



Présentée le 9 Juin 1995 devant la commission d'examen

**Président :** Professeur André VERBERT

**Rapporteurs :** Docteur Antony CORFIELD

Docteur Hélène BOUREAU

**Examineurs :** Professeur Philippe ROUSSEL

Professeur Jean MONTREUIL (*Emerite*)

Professeur Stéphane BOUQUELET

Ces travaux ont été réalisés dans le laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Technologies de Lille (Relations structure-fonction des constituants membranaires, Unité Mixte de Recherche n°111 du CNRS, Directeur : Professeur André VERBERT) sous la direction du Professeur Stéphane BOUQUELET.

Nous avons bénéficié d'une allocation du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

L'ensemble des travaux menés au laboratoire a fait l'objet des communications et publications suivantes :

## **Communications :**

### **Orales :**

**I. FONTAINE, E. AISSI et S. BOUQUELET**

Mécanisme d'interaction de *Bifidobacterium bifidum* souche AA2/2 sur la muqueuse intestinale. XIX<sup>ème</sup> Forum des Jeunes Chercheurs de la Société Française de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Caen, 7-10 Juillet 1992

**I. FONTAINE, E. AISSI et S. BOUQUELET**

Mise en évidence de structures responsables de l'adhésion de *Bifidobacterium bifidum* avec la muqueuse intestinale.

XXI<sup>ème</sup> Forum des Jeunes Chercheurs de la Société Française de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Reims, 5-8 Juillet 1994

### **Affiches :**

**I. FONTAINE, E. AISSI et S. BOUQUELET**

Mise en évidence de l'interaction de la copule glucidique dans les phénomènes de reconnaissance entre bifidobactéries et muqueuse intestinale.

XIV<sup>ème</sup> journées sur la Chimie et la Biochimie des Glucides, Villeneuve d'Ascq, 2-4 Septembre 1992.

**I. FONTAINE, E. AISSI and S. BOUQUELET**

In Vitro binding of *Bifidobacterium bifidum* to mucus glycoproteins and haemagglutinating activity.

5th Joint Meeting of Nederlandse Vereniging voor de Bestudering van Glycoconjugaten and the Studiengruppe Glykokonjugate der GBCh, Münster, october 15-16, 1993

**I. FONTAINE, E. AISSI and S. BOUQUELET**

In Vitro binding of *Bifidobacterium bifidum* to mucus glycoproteins.

6th Joint Meeting of Nederlandse Vereniging voor de Bestudering van Glycoconjugaten and the Studiengruppe Glykokonjugate der GBCh, Lille, september 19-20, 1994

**Publication :**

**I. F. FONTAINE, E. A. AISSI and S. J-L. BOUQUELET**

*In Vitro* binding of *Bifidobacterium bifidum* to mucus glycoproteins and haemagglutinating activity.

Current Microbiol., **28**, 325-330 (1994)

**I. F. FONTAINE, E. A. AISSI and S. J-L. BOUQUELET**

Characteristics of the Adhesive Determinants of *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082 to intestinal mucin, soumis à publication dans Current Microbiol.

Abréviations.....	8
Index des figures.....	9
Index des tableaux.....	11
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>12</b>
<b>GENERALITES.....</b>	<b>15</b>
<b><u>LES BIFIDOBACTERIES.....</u></b>	<b>16</b>
<b>I-BIOLOGIE DU GENRE <i>BIFIDOBACTERIUM</i>.....</b>	<b>16</b>
<b>A-CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES.....</b>	<b>16</b>
1-Pléomorphisme et genre bifide.....	17
2-Ultrastructure.....	19
a-Composition de la paroi.....	19
b-Membrane cytoplasmique et complexes membranaires.....	20
<b>B-CARACTERISTIQUES PHYSIOLOGIQUES.....</b>	<b>20</b>
1-Anaérobiose.....	20
2-Température et pH.....	23
<b>C-BESOINS NUTRITIONNELS.....</b>	<b>23</b>
1-Nutrition azotée.....	23
2-Nutrition minérale.....	23
3-Besoins vitaminiques.....	24
4-Facteurs bifidigènes.....	24
<b>D-CARACTERISTIQUES METABOLIQUES.....</b>	<b>25</b>
<b>E-DETERMINATION DE L'ESPECE.....</b>	<b>26</b>
<b>F-CONCLUSION.....</b>	<b>26</b>
<b>II-ECOLOGIE DES BIFIDOBACTERIES.....</b>	<b>29</b>

A-ETABLISSEMENT DE LA FLORE BIFIDE CHEZ LE NOUVEAU-NE.....	29
1-mode de naissance.....	30
2-Alimentation.....	30
 B-ROLE DE LA FLORE BIFIDE CHEZ L'ENFANT ET EVOLUTION CHEZ L'ADULTE.....	 32
 <b><u>LES PROBIOTIQUES</u></b> .....	 34
 <b>I-DEFINITION</b> .....	 34
 <b>II-MODE D'ACTION DANS LE TUBE DIGESTIF</b> .....	 35
 <b>III-LES BIFIDOBACTÉRIES EN TANT QUE PROBIOTIQUES</b> .....	 36
A-TRANSIT GASTRIQUE ET INTESTINAL.....	36
B-LES EFFETS SUR LA FLORE INTESTINALE.....	37
C-LES EFFETS PHYSIOLOGIQUES.....	37
D-CONCLUSION.....	39
 <b><u>MECANISME GENERAL DES INTERACTIONS ADHESINE-RECEPTEUR</u></b> .....	 39
 <b>I-STRUCTURE DES ADHESINES</b> .....	 40
A-ADHESINES DE NATURE PROTÉIQUE.....	40
B-ADHESINES DE NATURE NON PROTÉIQUE.....	40
1-L'acide lipotéichoïque.....	40
2-La capsule exopolysaccharidique.....	40
C-EXPRESSION DES ADHÉSINES.....	41

<b>II-LES RECEPTEURS DE LA SURFACE INTESTINALE.....</b>	<b>42</b>
<b>A-LES RECEPTEURS GLYCANNIQUES.....</b>	<b>42</b>
1-Les glycolipides.....	42
2-Les glycoprotéines.....	42
a-Les O-glycannes de type mucines.....	43
b-L'axe peptidique des mucines.....	44
<b>B-LES RÉCEPTEURS PROTÉIQUES.....</b>	<b>44</b>
 <b>MATERIELS ET METHODES.....</b>	 <b>46</b>
 <b>I-CONDITIONS DE CULTURE DE <i>BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM</i>.....</b>	 <b>47</b>
A-SOUCHES UTILISÉES.....	47
B-COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE.....	47
C-CONDITIONS DE CULTURE.....	48
 <b>II-ACTIVITÉS ENZYMATIQUES DE <i>B. BIFIDUM</i>.....</b>	 <b>49</b>
 <b>III-ETUDE DE L'ADHÉRENCE DE <i>B. BIFIDUM</i>.....</b>	 <b>49</b>
A-MISE EN ÉVIDENCE DU POUVOIR HÉMAGGLUTINANT DE <i>BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM</i> .....	49
1- Détection du seuil d'hémagglutination.....	50
2-Spécificité des agglutinines vis à vis des différents groupes sanguins.....	50
3-Inhibition de l'hémagglutination.....	50
 B-DÉTECTION DE L'ADHÉRENCE DES <i>B.BIFIDUM</i> AUX MUCINES PAR LA TECHNIQUE DES " DOTS " .....	51
1-Préparation d'un anti-sérum anti-bifide.....	51
2-Contrôle de l'immunisation des Lapins.....	51
3-Mise en évidence de la reconnaissance des mucines gastriques de Porc	

par <i>B. bifidum</i> .....	52
<b>C-ADAPTATION DES DIFFÉRENTS PARAMÈTRES DU TEST ELISA À L'ÉTUDE DE LA FIXATION DE <i>B. BIFIDUM</i> AUX MUCINES.....</b>	<b>52</b>
1- Influence de la concentration en mucines et du pH du tampon de solubilisation des mucines.....	53
2- Influence de la concentration en bactéries.....	54
3-Influence du temps d'incubation des bifidobactéries sur leur fixation spécifique.....	54
4-Inhibition de l'adhérence aux glycoprotéines.....	54
<b>D-INFLUENCE DE L'ÉTAT PHYSIOLOGIQUE DE LA BACTÉRIE SUR L'ADHÉRENCE.....</b>	<b>54</b>
1-Suivi de l'adhérence des bactéries aux différents temps de culture et en fonction des conditions de cultures par la technique ELISA.....	54
2-Spécificité d'adhérence des différentes souches de <i>B. bifidum</i> .....	56
3-Influence du milieu de culture dans l'adhérence bactérienne.....	56
4-Influence des ions Ca <sup>2+</sup> et Mg <sup>2+</sup> sur l'adhérence aux mucines.....	56
5-Influence des traitements de conservation sur l'adhérence de la bactérie.....	56
6-Influence de l'acidité sur l'adhérence de la bactérie.....	57
<b>E-ADHERENCE DES BIFIDOBACTERIES AUX CELLULES EPITHELIALES HUMAINES.....</b>	<b>57</b>
1-Cellules et conditions de culture.....	57
2-Test d'adhérence.....	57
<b>F-VARIATION DU TAUX D'ADHÉRENCE SELON LA NATURE DES GLYCOPROTÉINES IMMOBILISÉES.....</b>	<b>58</b>
1-Purification des mucines.....	58
2-Traitements des mucines.....	59
a-Déglycosylation chimique par clivage alcalin des liaisons O-glycosidiques.....	59
b-Déglycosylation enzymatique des glycoprotéines.....	59
c-Oxydation périodique des mucines.....	59

d-Hydrolyse protéasique des mucines.....	61
<b>G-MISE EN EVIDENCE DE STRUCTURES BACTERIENNES</b>	
<b>RESPONSABLES DE L'ADHERENCE AUX MUCINES.....</b>	<b>61</b>
1-Traitement de la bactérie par la chaleur et l'action des protéases.....	61
2-Adhésion des milieux de culture après différents temps de culture.....	61
3-Mise en évidence de structures bactériennes dans le tampon d'incubation....	61
4-Isolement de structures bactériennes.....	62
a-Solubilisation par les détergents.....	62
b-Solubilisation par les protéases.....	62
5-Electrophorèse en gel de polyacrylamide, en conditions dénaturantes.....	62
6-Electrotransfert sur membrane de nitrocellulose.....	62
7-Détection des protéines après transfert sur nitrocellulose.....	63
8-Marquage des mucines gastriques de Porc à la Biotine.....	64
9-Détection des propriétés adhérentes par la technique ELISA.....	64
<b>RESULTATS ET DISCUSSIONS.....</b>	<b>65</b>
<b><u>MISE EN EVIDENCE D'UNE INTERACTION SPECIFIQUE ENTRE</u></b>	
<b><u>BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM ET LA MUQUEUSE INTESTINALE.....</u></b>	<b>66</b>
<b>I-MATÉRIEL BIOLOGIQUE ÉTUDIÉ : <i>BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM</i>.....</b>	<b>66</b>
<b>II-MISE EN ÉVIDENCE DU POUVOIR HÉMAGGLUTINANT DES</b>	
<b>BIFIDOBACTÉRIES.....</b>	<b>66</b>
<b>III- MISE EN ÉVIDENCE D'UNE INTERACTION MUCINE-<i>B. BIFIDUM</i>.....</b>	<b>68</b>
A-PAR LA MÉTHODE DES " DOTS ".....	68
B-PAR LA TECHNIQUE ELISA.....	69
1-Influence de la concentration en mucines et du pH du tampon	
d'immobilisation des mucines.....	69
2-Influence de la concentration bactérienne et du temps d'incubation sur	
la spécificité d'adhésion.....	69

<b>IV- ETUDE DE LA SPECIFICITE DE LA REACTION D'ADHERENCE BACTERIENNE AUX MUCINES.....</b>	<b>71</b>
A-VARIATION D'ADHÉRENCE DES BIFIDOBACTÉRIES AU COURS DE LEUR CROISSANCE.....	71
B-VARIATIONS D'ADHÉRENCE SELON LA SOUCHE DE <i>B. BIFIDUM</i> .....	73
C-VARIATIONS D'ADHÉRENCE EN FONCTION DE DIFFÉRENTS PARAMÈTRES.....	73
1-Milieu de culture.....	73
2-Influence des cations.....	78
3-Influence des moyens de conservation de la souche.....	78
<b>V-MISE EN ÉVIDENCE D'UNE INTERACTION CELLULES INTESTINALES-B. BIFIDUM.....</b>	<b>81</b>
<b>VI -CONCLUSIONS.....</b>	<b>84</b>
<b><u>ADHESINES DE BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM</u>.....</b>	<b>84</b>
<b>I-CARACTÉRISATION D'ADHÉSINES À LA SURFACE DE <i>B. BIFIDUM</i>.....</b>	<b>84</b>
A-ACTION DE LA TEMPÉRATURE.....	84
B-ACTION DES PROTÉASES.....	85
C-AUTOLYSE DU SYSTÈME.....	85
<b>II-PREPARATION DES ADHESINES.....</b>	<b>88</b>
A-SOLUBILISATION DES ADHÉSINES PAR LES DÉTERGENTS.....	88
B-ANALYSE DES PRODUITS APRÈS EXTRACTION PAR LES DÉTERGENTS.....	92

C-PROTÉOLYSE DES BIFIDOBACTÉRIES.....	92
<b><u>CARACTÉRISATION DU SITE RECEPTEUR DES ADHÉSINES ET</u></b> <b><u>AGGLUTININES</u></b> .....	97
<b>I- PURIFICATION DE MUCINES</b> .....	97
<b>II-VARIATION DU TAUX D'ADHÉRENCE SELON LA NATURE DES</b> <b>GLYCOPROTÉINES IMMOBILISÉES</b> .....	99
<b>III-VARIATION DE L'ACTIVITÉ GLYCOSIDASIQUE EN FONCTION DE</b> <b>L'ORIGINE DES MUCINES</b> .....	99
<b>IV-INHIBITION DE L'ADHÉRENCE ET DE L'HÉMAGGLUTINATION PAR</b> <b>DIFFÉRENTES STRUCTURES SACCHARIDIQUES</b> .....	101
A-SPECIFICITE DE LA REACTION D'HEMAGGLUTINATION.....	101
B-INHIBITION DE L'HEMAGGLUTINATION.....	101
C-INHIBITION DE L'ADHERENCE.....	103
1-Inhibition de l'adhérence par des glycoprotéines.....	105
2-Inhibition de l'adhérence par des structures accharidiques.....	105
3-Inhibition de l'adhérence par des mucines modifiées.....	106
<b>CONCLUSION GENERALE</b> .....	109
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	115
Annexes.....	131

# Abréviations

A.....	Absorbance
ADN.....	Acide désoxyribonucléique
CCM.....	Chromatographie en couche mince
EDTA.....	Acide éthylène diamine tétra-acétique
ELISA.....	Enzyme-linked immunosorbent assay
Fuc.....	L-fucose
Gal.....	D-galactose
GalNAc.....	N-acétyl-D-galactosamine
Glc.....	D-glucose
GlcNAc.....	N-acétyl-D-glucosamine
Hepes.....	Acide-2-Hydroxy-éthylpipérazine-N-2-éthane sulfonique
Ig.....	Immunoglobuline
MurNAC.....	acide N-acétylmuramique
NAD.....	nicotinamide adenine dinucléotide
NeuNAc.....	Acide N-acétylneuraminique
PBS.....	Phosphate buffered saline
PMSF.....	Phénylméthane-sulfonyl fluoride
p/v.....	poids / volume
SDS.....	Sodium dodécylsulfate
TPY.....	Trypticase-phytone-yeast
Tris.....	2-amino-2-(hydroxyméthyl)-1,3-propanediol
v/v.....	volume / volume
var b.....	variant b

## Index des figures

Figure 1 : Observation en microscopie électronique de <i>Bifidobacterium bifidum</i> AA 2/2 (formes bâtonnets).....	18
Figure 2 : Observation en microscopie électronique de <i>Bifidobacterium bifidum</i> AA 2/2 (formes bifides).....	18
Figure 3 : Schéma de l'enveloppe cellulaire des bactéries à Gram positif.....	21
Figure 4 : Microscopie électronique à transmission sur coupes ultra-fine de <i>B. bifidum</i> DSM 20082, cultivé en milieu TPY.....	22
Figure 5 : Influence du type d'allaitement sur la composition de la flore fécale du nourrisson selon Mitsuoka et Kaneuchi, 1977.....	31
Figure 6 : Différences entre les espèces bactériennes retrouvées dans les fèces, selon l'âge des personnes, selon Mitsuoka et Hayakawa, 1972.....	33
Figure 7 : Représentation schématique des chaînes glucidiques des glycoprotéines de type mucine (selon Hounsel et Feizi, 1982).....	45
Figure 8 : Représentation schématique de la structure d'un type de mucines (mucines gastriques de Rat selon Strous et Dekker, 1992).....	45
Figure 9 : Schéma d'isolement des différentes fractions glycosidiques après hydrolyse des mucines par l'extrait enzymatique de <i>B. bifidum</i> .....	55
Figure 10 : Caractérisation du récepteur des mucines par inhibition de l'adhérence.....	60
Figure 11 : Courbe de croissance et variation du pH au cours d'une culture de <i>B. Bifidum</i> sur milieu TPY.....	67
Figure 12 : Influence du pH sur l'immobilisation des mucines.....	70
Figure 13 : Influence de la concentration en bactéries sur la spécificité de fixation.....	72
Figure 14 : Influence du temps d'incubation sur la spécificité de fixation des bifidobactéries.....	72
Figure 15 : Spécificité de fixation au cours de la croissance bactérienne (pH non régulé).....	74
Figure 16 : Spécificité de fixation au cours de la croissance bactérienne (pH régulé).....	74
Figure 17 : Spécificité de fixation des différentes souches de <i>B. bifidum</i> étudiées.....	76
Figure 18 : Influence du milieu de culture sur l'adhérence de <i>B. bifidum</i> .....	76
Figure 19 : Electrophorèse en milieu dénaturant du milieu de culture de <i>B. bifidum</i> .....	79
Figure 20 : Influence de la température de conservation sur la spécificité d'adhérence de <i>B. bifidum</i> .....	80
Figure 21 : Adhérence de <i>B. bifidum</i> aux cellules HT-29 et HT-29-MTX en fonction du temps de culture; suivi de l'hydrophobicité bactérienne en fonction du	

temps de culture.....	82
Figure 22 : Modification des propriétés adhérentes et des activités glycosidasiques de <i>B. bifidum</i> après un choc thermique.....	86
Figure 23 : Modification des propriétés adhérentes et des activités glycosidasiques de <i>B. bifidum</i> au cours de l'hydrolyse protéasique.....	86
Figure 24 : Electrophorèse en milieu dénaturant des surnageants obtenus après incubation de <i>B. bifidum</i> en tampon Bis-Tris 50 mM, pH 6,8 à 4°C.....	87
Figure 25 : Influence d'un traitement doux par le Zwittergent 3-14 sur la spécificité d'adhérence de <i>B. bifidum</i> DSM 20082.....	91
Figure 26 : Electrophorèse en milieu dénaturant des protéines de la surface de <i>B. bifidum</i> extraites par les détergents.....	93
Figure 27 : Electrophorèse en milieu dénaturant des protéines de la surface de <i>B. bifidum</i> obtenues par traitement protéasique.....	95
Figure 28 : Profil de purification de mucines sur Sepharose 4B.....	98
Figure 29 : Adhérence de <i>B. bifidum</i> en fonction de l'origine des glycosylprotéines immobilisées.....	100
Figure 30 : Hydrolyse de différentes O-glycosylprotéines par <i>B. bifidum</i> .....	100
Figure 31 : Modèle du mécanisme d'adhérence de <i>B. bifidum</i> à la muqueuse intestinale.....	113

## Index des tableaux

Tableau I : Souches types et habitats des espèces du genre <i>Bifidobacterium</i> (selon Bahaka <i>et al.</i> , 1993).....	27
Tableau II : Evolution de la fréquence des espèces de <i>Bifidobacterium</i> en fonction des différents groupes d'âge (selon Mitsuoka et Kaneuchi, 1977).....	33
Tableau III : Résultats expérimentaux des effets exercés par les bifidobactéries.....	38
Tableau IV : Adhérence des structures présentes dans le milieu de culture, au polystyrène et aux mucines immobilisées.....	77
Tableau V : Mesure de l'adhérence de <i>B. bifidum</i> après traitement par les détergents.....	89
Tableau VI : Inhibition par les mucines de la fixation des extraits membranaires au polystyrène et aux mucines immobilisées.....	91
Tableau VII : Altération des propriétés adhérentes de <i>B. bifidum</i> par un traitement protéasique.....	94
Tableau VIII : Inhibition de l'activité hémagglutinante de <i>B. bifidum</i> .....	102
Tableau IX : Inhibition de l'adhérence de <i>B. bifidum</i> aux glycoprotéines immobilisées.....	104

# Introduction

Cela fait 8 ans maintenant, que le premier lait fermenté aux bifidobactéries a été lancé en France. Ce type de produit représente une part importante et croissante des ventes de produits laitiers frais. Cet engouement commercial est le résultat d'une campagne publicitaire habilement menée autour des "bienfaits santé" attribués à ces produits. Il faut dire qu'à ce sujet, on ne fait que reprendre des observations qui remontent au début de ce siècle. Dès 1900, Tissier démontrait la présence d'une population bactérienne dominante : les bifidobactéries, dans les selles des nourrissons allaités au sein. A la même époque, paraissait le livre de E. Metchnikoff, lauréat du prix Nobel de Médecine, dans lequel était fait l'apologie des bactéries lactiques quant à leur incidence sur la santé et la longévité des êtres humains. Ayant eu connaissance des travaux de Tissier (1900), il va jusqu'à supposer qu'il est possible de soigner des diarrhées infantiles par l'administration orale de fortes doses de bifidobactéries. Les observations de Kling (1914), de l'école de Metchnikoff, montrent bien *in vitro* les potentialités antibactériennes du *Bacillus bifidum* de Tissier. A celles-ci, il faut ajouter le fait que les enfants nourris au sein présentent des taux de mortalité et de morbidité bien inférieurs à ceux d'enfants nourris au biberon (Robinson, 1951).

Ces deux observations rapprochées ont conduit de nombreux auteurs à admettre que la présence du "bifidus" dans l'intestin du nourrisson élevé au sein, était la cause directe de son état de résistance plus élevé. C'est aussi à cette époque qu'est apparu le concept de facteurs bifidigènes, facteurs spécifiques de prolifération et de maintien de la flore bifide dans l'intestin. Suite aux travaux de Manciaux (1958), relayés en cela par ceux de Van der Waays *et al.* (1971), on pense de plus en plus à utiliser la flore bifide comme agent probiotique. C'est au Japon, dans les années 1980, que se développe l'industrie laitière des bifidobactéries (Mitsuoka, 1982; Yamasaki *et al.*, 1985; Ebisawa *et al.*, 1987). Parallèlement, les propriétés probiotiques de ces produits sont étudiées par de nombreuses équipes (Hamzé, 1984; Fernandes *et al.*, 1987; Asselin, 1988; Romond, 1988; Bottazzi, 1990).

Depuis lors, de nombreux travaux ont été entrepris dans l'espoir de découvrir par quels mécanismes ces bactéries peuvent agir, depuis l'intestin, sur l'état de santé d'un individu.

Comme pour tout microorganisme au niveau intestinal, il ne peut y avoir d'implantation que dans la mesure où il y a dans un premier temps, une adhérence au support intestinal. Cette réaction est suivie d'une prolifération si les conditions nutritionnelles sont adéquates. Ce mécanisme pourrait expliquer les observations antérieures concernant le phénomène de barrière observé vis-à-vis de certaines bactéries quand il y a implantation de la flore bifide. On peut expliquer ce phénomène par différentes hypothèses.

- la première qui vient à l'esprit est le fait que les bifidobactéries, comme les bactéries lactiques, vont générer des acides organiques (acide lactique, acide acétique.....) susceptibles d'abaisser le pH et d'inhiber la croissance de certains microorganismes.

- la deuxième, qui peut être formulée, concernerait la production de substances antibactériennes spécifiques.

- la troisième concerne l'interaction des bifidobactéries avec la muqueuse intestinale.

Ces organismes viendraient occuper des récepteurs de la muqueuse et empêcheraient de cette manière l'adhérence des autres bactéries, donc leur implantation et leur prolifération.

Dans ce cas, on peut envisager que l'adhérence se fera par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques aux bifidobactéries, présents au niveau de la muqueuse ou apparaissant après traitement par les systèmes enzymatiques de la bactérie.

Le travail qui nous a été confié au cours de cette thèse concerne l'étude des modalités d'adhérence de *Bifidobacterium bifidum* au niveau de la muqueuse intestinale. Il comprend trois axes de recherches.

(i) Mise au point de techniques permettant de visualiser et de quantifier les interactions entre *B. bifidum* et les mucines. Nous avons d'abord utilisé la réaction d'hémagglutination, méthode très employée comme modèle de l'adhésion bactérienne aux surfaces cellulaires. Nous avons ensuite choisi d'étudier ce mécanisme d'interaction par une méthode ELISA, puis nous avons étendu nos recherches au modèle cellulaire par l'étude de l'adhérence de *Bifidobacterium bifidum* aux cellules de carcinome humain (cellules HT-29 et HT-29-MTX).

(ii) En fonction de ces données, nous avons entrepris la mise en évidence et la caractérisation de l' (ou des) adhésine(s) de *Bifidobacterium bifidum* impliquée(s) dans la reconnaissance des mucines.

(iii) Nous avons enfin tenté de définir la nature des récepteurs impliqués dans la reconnaissance bactéries/mucines.

Avant d'exposer les résultats obtenus, nous présenterons quelques généralités concernant les bifidobactéries et leur rôle grandissant dans l'alimentation humaine.

# **Généralités**

S'il est encore très difficile de définir le rôle joué par les bifidobactéries au niveau intestinal, on inclut de plus en plus ce germe dans les probiotiques. Par définition, les probiotiques sont des préparations contenant des microorganismes, vivants ou non, et leurs métabolites, utilisés comme additifs alimentaires, et qui affectent de façon bénéfique l'organisme hôte (Smoragiewicz, 1993).

Afin d'expliquer les propriétés de probiotiques des bifidobactéries, nous allons d'abord nous pencher sur la biologie de ce genre. Nous décrirons ensuite son environnement naturel au sein de la flore intestinale et nous évaluerons ses capacités de probiotique. La propension des probiotiques à coloniser le tube digestif découle essentiellement de leurs propriétés d'adhésion, nous étudierons donc les différents modes d'adhésion bactérienne et la structure des récepteurs potentiels rencontrés à la surface de l'épithélium intestinal.

## **LES BIFIDOBACTERIES**

### **I-BIOLOGIE DU GENRE *BIFIDOBACTERIUM***

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.

#### **A- CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES**

Tissier, en 1900, décrit 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 au sein de mêmes cultures, on peut rencontrer des formes plus ou moins bulbeuses et plus ou moins ramifiées. Ces formes varient non seulement en fonction du milieu de culture, mais aussi en fonction de l'âge de la culture. Ce pléomorphisme provoque dans un premier temps une polémique sur l'originalité de la découverte de Tissier, puis soulève 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), permit une étude systématique de la morphologie. Une comparaison des formes des différentes espèces cultivées en anaérobiose dans un milieu trypticase-peptone-extrait de levure (TPY), montre que certaines bifidobactéries ont des formes caractéristiques qui peuvent éventuellement être utilisées comme critère de classification.

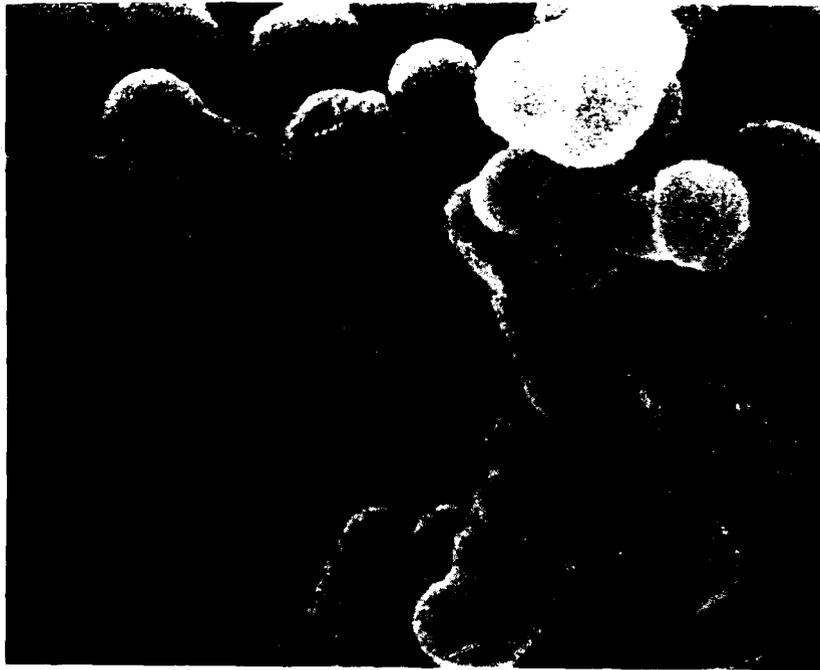
### 1-Pléomorphisme et forme bifide

Poupart *et al.* (1973) retracent dans une revue générale l'histoire 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 à la fois des formes bifides en Y ou en V, ainsi que des formes courbes en spatule ou en massue. Par contre, dans des subcultures, les bâtonnets plus ou moins recourbés sont prédominants, mais présentent des irrégularités qui leur confèrent des formes branchées. Enfin, dans des conditions de culture défavorables, le pléomorphisme se rencontre systématiquement (figures 1 et 2, page 18).

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

Les sels interviennent également dans l'apparition des formes bifides. Kojima *et al.*, en 1968, constatent 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 montrent que la teneur en ion calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) des cellules et des parois est plus faible pour la forme bifide que pour les formes bacillaires; de plus, l'addition de chélateur ou de  $\text{CaCl}_2$  fait varier la nature des formes observées.

La présence de certains acides aminés influence également ce pléomorphisme: Husain *et al.*, en 1972, montrent 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. Cummins *et al.* (1957) et 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.



x 28 000

Figure 1 : Observation en microscopie électronique de *Bifidobacterium bifidum* AA 2/2 (formes bâtonnets)



x 28 000

Figure 2 : Observation en microscopie électronique de *Bifidobacterium bifidum* AA 2/2 (formes bifides)

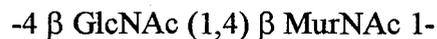
En conclusion, on peut citer Poupard *et al.* (1973) qui, en combinant différents milieux de culture, arrivent à maintenir différentes souches dans une morphologie prédéterminée. Ils ont émis l'hypothèse que la forme branchée ne serait pas une dégénérescence de la forme bifide, mais plutôt une forme d'adaptation à un environnement nutritionnel non optimal.

## 2- Ultrastructure

L'organisation des bifidobactéries se rapproche de celle des autres procaryotes à gram positif. Le matériel nucléaire baigne dans la région centrale du cytoplasme, celui-ci est protégé de l'environnement extérieur d'abord par une membrane cytoplasmique puis par une paroi plus rigide:

### a-Composition de la paroi

La paroi des bactéries à gram positif se caractérise par la présence d'un constituant majeur, le peptidoglycane, responsable de la rigidité des cellules (Schleifer et Kandler, 1972). Le polysaccharide est constitué d'unités disaccharidiques de répétition :



La rigidité est conférée par des liaisons croisées constituées d'enchaînements peptidiques. L'étude de la structure du peptidoglycane de la muréine des bifidobactéries a été essentiellement réalisée par l'équipe de Kandler (1968, 1970 et 1974). Kandler *et al.* (1968) confirment l'étude réalisée par Cummins *et al.* (1957) sur la composition en acides aminés de la paroi. Si, on retrouve dans toutes les souches étudiées de l'alanine, de l'acide glutamique, de la lysine, ainsi que de la glucosamine et de l'acide muramique, en revanche, la sérine, le glycofolle, la thréonine et l'acide aspartique sont spécifiques de certaines souches.

Les variations de structure de la paroi des bifidobactéries sont maintenant utilisées pour caractériser les espèces. De même, la structure des sucres de la paroi bactérienne commence à être étudiée sans que l'on puisse encore utiliser ces résultats pour comparer les espèces. En plus de la glucosamine et de l'acide muramique, le polysaccharide de la paroi bactérienne de *B. bifidum* ssp. *Pennsylvanicus* contient des quantités importantes de mannitol, rhamnose, glucose et phosphate et une quantité plus faible de glycérol et de galactose (Veerkamp *et al.*, 1983), le polysaccharide de *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis* et *B. longum* résulterait de la répétition d'une unité de base contenant du glucose et du galactose (Habu *et al.*, 1987).

Ce peptidoglycane est associé à un autre type de polymère, les acides teichoïques. Ces composés de faible poids moléculaire sont constitués de mannitol ou de glycérol reliés par des

liaisons phosphodiester. Op den Camp *et al.* (1984) démontre l'existence d'acides teichoïques associés aux lipides (acide lipotéichoïque). Ces acides lipotéichoïques seraient en quantité suffisantes pour conférer à la bactérie des propriétés hydrophobes (Op den Camp *et al.*, 1985 b).

Certaines souches de bifidobactéries possèdent des variants sécréteurs de polysaccharides. Ces polysaccharides bactériens formeraient une gangue autour de la bactérie, et seraient liés de façon plus ou moins lâche à la bactérie (Vogel, 1952; Wang *et al.*, 1963; Sato *et al.*, 1982).

Pour résumer toutes ces informations, la figure 3, page 21 illustre l'architecture de l'enveloppe cellulaire des bactéries à Gram +.

### b-Membrane cytoplasmique et complexes membranaires

La membrane cytoplasmique de *B. bifidum* apparaît comme une structure de 9 nm d'épaisseur, composée de trois feuillet superposés. On observe également des invaginations de cette membrane présentes à l'intérieur du cytoplasme, appelées mésosomes.

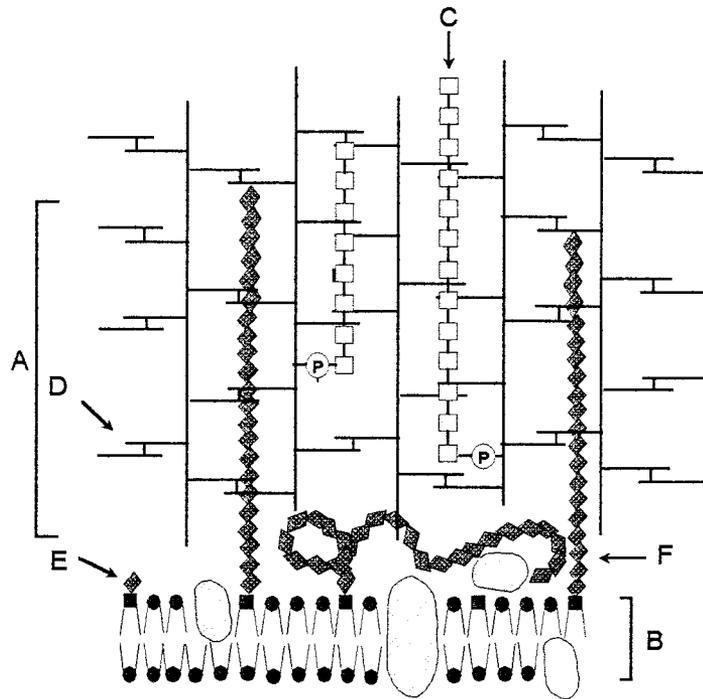
Plusieurs hypothèses ont été émises : pour certains auteurs, ces mésosomes joueraient un rôle dans la division cellulaire (Fitz-James, 1960, Greenawalt and Whiteside, 1976). D'autres pensent que ces structures ne sont que des artefacts liés aux techniques de préparations des bactéries avant leur observation en microscopie électronique (Higgins *et al.*, 1981). La présence ou l'absence de ces structures mésosomales semble dépendre de l'espèce et des conditions de cultures. Chez *B. bifidum* DSM 20082, cultivé sur TPY, on observe bien ces mésosomes (figure 4 , page 22).

## B-CARACTERISTIQUES PHYSIOLOGIQUES

### 1-Anaérobiose

Les bifidobactéries sont généralement considérées comme des organismes anaérobies stricts, mais certaines souches ou certaines espèces sont plus ou moins tolérantes vis-à-vis de l'oxygène en présence de CO<sub>2</sub>. Deux explications ont été avancées pour expliquer cette particularité:

- Les bifidobactéries, sont plus ou moins sensibles à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 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



**Figure 3 : Schéma de l'enveloppe cellulaire des bactéries à Gram positif.**

A : paroi; B : membrane cytoplasmique; C : acide téichoïque; D : peptidoglycane; E : phosphatidylglycolipide; F : acide lipotéichoïque.



x 28000

**Figure 4 : Observation en microscopie électronique à transmission sur coupes ultra-fine de *B. bifidum* DSM 20082, cultivé en milieu TPY.**

Les coupes sont contrastées par la technique de Thiery (1967). Cette méthode permet de mettre en évidence les polysaccharides intracellulaires et extracellulaires, liés à la paroi, et les structures mésosomales.

traces de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> présentes, soit de la NADH oxydase dont l'action dans certains cas n'induit pas la formation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

- 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.

## 2-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 animale ont généralement des températures optimales de croissance plus élevées et se développent encore à 46°C (Buchanan *et al.*, 1974, Rasic et Kurmann, 1983;).

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).

## C- 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.

### 1-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 (Matteuzzi *et al.*, 1978). *B. bifidum* peut excréter jusqu'à 150 mg/l de thréonine (Scardovi, 1986).

### 2-Nutrition minérale :

La nutrition minérale a surtout été étudiée chez *Bifidobacterium bifidum* qui a besoin de Fer (Fe<sup>2+</sup> et Fe<sup>3+</sup>), Zinc (Zn<sup>2+</sup>), Cuivre (Cu<sup>2+</sup>), Manganèse (Mn<sup>2+</sup>) et Magnésium (Mg<sup>2+</sup>) 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 ( $\text{Fe}^{3+}$ ) et ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Le Fer ferrique est assimilé à pH neutre (Ueda *et al.*, 1983; Bezkorovainy *et al.*, 1986), le Fer ferreux à pH acide (Topouzian et Bezkorovainy, 1986) et son transport sous forme libre ( $\text{Fe}^{2+}$ ) 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  $\text{Fe}^{2+}$  et peut être piégé par les bifidobactéries, ce qui entraînerait une déplétion en Fer pour les autres microorganismes.

### 3-Besoins vitaminiques :

Les exigences en vitamines ne dépendent pas des différentes niches écologiques. Deguchi *et al.* (1985) ont montré que certaines espèces sont capables de libérer dans le milieu des vitamines, en particulier de la thiamine, de l'acide nicotinique et de l'acide folique.

### 4-Facteurs bifidigènes :

Les facteurs bifidigènes sont des facteurs de croissance nécessaires au développement de *Bifidobacterium bifidum*. 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 20 ans pour réussir à les identifier.

Les facteurs bifidigènes sont de nature complexe. 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

Le lactulose est un disaccharide composé d'une molécule de galactose et d'une molécule de fructose résultant de la transformation du lactose par chauffage du lait. L'adjonction de ce disaccharide au lait fabriqué industriellement provoquerait la croissance des *Bifidobacterium* aussi bien chez le nourrisson que chez l'adulte. (Petuely, 1957; Raynaud, 1959; Hoffman *et al.*, 1964; Yoshioka, 1971).

- les oligosaccharides contenant de la N-acétylglucosamine appelés bifidus facteur 1 (BF1)

Ce facteur bifidigène du lait humain se retrouve également dans les sécrétions humaines (Gyorgy *et al.* 1954). C'est un mélange très complexe de nombreux oligosaccharides neutres (Polonowski et Lespagnol, 1930; Khün et Baer, 1956; Montreuil, 1956; Grimmonprez et Montreuil, 1968) ou acides (Kühn, 1958, 1959; Grimmonprez et Montreuil, 1968). 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 Rose en 1955(b).

- les peptides obtenus par digestion enzymatique de la caséine, ou bifidus facteur 2 (BF2), ou encore facteur de Raynaud.

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 est actif surtout sur le *variant a* de *Bifidobacterium bifidum*, il possède une activité plus faible sur le *variant b* (Neimann *et al.*, 1959; Raynaud, 1959; Rose et Gyorgy, 1963; Raynaud et Bizzini, 1971; Kehagias *et al.*, 1977; Seka Assi, 1982).

-des constituants divers

D'autres molécules sont susceptibles d'entraîner la prolifération des bifidobactéries. On remarque des produits aussi variés que les glycoprotéines du colostrum humain (Hirano *et al.* 1968; Nichols *et al.*, 1974) et de vache (Nichols *et al.*, 1974), le jus de carotte (Gyorgy et Rose, 1955a; Kuromiya, 1960; Yoshioka *et al.*, 1968; Ohta *et al.*, 1971) ou des oligosaccharides produits par d'autres bactéries (Homma and Kohno, 1960; Yamashita *et al.*, 1976; Tanaka *et al.*, 1983). Les fructooligosaccharides permettent la prolifération des bifidobactéries chez les personnes âgées (Modler *et al.*, 1990).

## D-CARACTERISTIQUES METABOLIQUES : métabolisme des sucres

Si 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 Trovattelli, 1965; De Vries *et al.*, 1967; Veerkamp, 1969).

## E-DETERMINATION DE L'ESPÈCE

La taxonomie des bifidobactéries a constamment évolué depuis leur isolement. Aucun test n'existe à l'heure actuelle pour déterminer l'origine d'une souche et le système de classification en origine "humaine" ou "animale" est basé arbitrairement sur la taxonomie de la souche. La définition des espèces bactériennes dépend des critères pris en compte pour la classification mais également des méthodologies utilisées.

Les critères biochimiques reposant essentiellement sur la fermentation des sucres ont souvent été utilisés pour la classification des bifidobactéries (Mitsuoka, 1974). Récemment Gavini *et al.* (1991) ont proposé des critères de fermentation des glucides (sorbitol, D-xylose, mélézitose et raffinose), couplés à des critères de croissance à 45°C pour différencier les souches d'origine animale et humaine.

On voit actuellement de plus en plus se développer des techniques plus modernes comme l'hybridation ADN-ADN (Scardovi *et al.*, 1971; Scardovi et Trovatelli, 1974) ou la caractérisation de certains composés cellulaires : constituants de la paroi (Cummins *et al.*, 1957; Kandler *et al.*, 1968; Kandler 1970; Kandler et Lauer, 1974; Veerkamp *et al.*, 1983; Habu *et al.*, 1987) et des protéines (Scardovi *et al.*, 1971; Sgorbati *et al.*, 1976; Scardovi *et al.*, 1979) ou encore l'utilisation de critères immunologiques (Scardovi *et al.*, 1979).

D'après une classification récente, il existerait actuellement 29 espèces décrites, 10 d'origine humaine, 17 d'origine animale et 2 isolées d'eaux usées (Tableau I, page 27 et 28)

## F- CONCLUSIONS

Historiquement le genre *Bifidobacterium* a été successivement assimilé aux genres *Bacillus*, *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Actinomyces*. Du point de vue morphologique, les bifidobactéries sont des bacilles, Gram +, anaérobies, qui 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*. La détermination exacte des différentes espèces est encore aléatoire malgré les nouvelles méthodes de détermination, c'est pourquoi les résultats

**Tableau I : Souches types et habitats des espèces du genre *Bifidobacterium* (selon Bahaka et al., 1993).**

Espèces	Souches types	Habitats
<b>Origine humaine</b>		
<i>B. bifidum</i> (ORLA-JENSEN, 1924)	Ti (=ATCC 29521)	Fèces enfant, adulte et vagin
<i>B. longum</i> (REUTER, 1963)	E194b (=ATCC 15707)	Fèces enfant, adulte et vagin
<i>B. infantis</i> (REUTER, 1963) (syn <i>B. liberorum</i> et <i>B. lactentis</i> ) REUTER(1971)	S 12 (=ATCC 15697)	Fèces enfant et vagin
<i>B. breve</i> (REUTER, 1963) (syn: <i>B. parvulorum</i> )	SI (=ATCC 15700)	Fèces enfant et vagin
<i>B. adolescentis</i> (REUTER, 1963), REUTER (1971)	E194a (=ATCC 15703)	Fèces adulte
<i>B. angulatum</i> (SCARDOVI et CROCIANI, 1974)	B677 (=ATCC 27535)	Fèces adulte
<i>B. catenulatum</i> (SCARDOVI et CROCIANI, 1974)	B669 (=ATCC 27539)	Fèces enfant, adulte et vagin
<i>B. pseudocatenulatum</i> (SCARDOVI et al., 1979)	B 1279 (=ATCC 27919)	Fèces enfant
<i>B. dentium</i> (SCARDOVI et CROCIANI, 1974)	B764 (=ATCC 27534)	Caries dentaires, cavité orale et fèces adulte
<i>B. gallicum</i> (LAUER, 1990)	DSM 20093	Fèces adulte
<b>Origine animale</b>		
<i>B. globosum</i> (SCARDOVI et al., 1969)	RU230 (=ATCC 25864)	Fèces porcelet, rat, lapin et agneau
<i>B. pseudolongum</i> (MITSUOKA, 1969)	PNC-2-9G (=ATCC 25526)	Fèces porcelet, poule, veau, rat et rumen de bovin
<i>B. cuniculi</i> (SCARDOVI et al., 1979)	RA93 (=ATCC 27916)	Fèces lapin
<i>B. choerinurn</i> (SCARDOVI et al., 1979)	SU806 (=ATCC 27686)	Fèces porcelet
<i>B. animalis</i> (SCARDOVI et TROVATELLI, 1974)	R 101-8 (=ATCC 25527)	Fèces rat, poule, lapin, veau
<i>B. thermophilus</i> (MITSUOKA, 1969) syn: <i>B. ruminale</i> )	P2-91 (=ATCC 25525)	Fèces porc, poule, veau, rumen de bovin
<i>B. boum</i> (SCARDOVI et al., 1979)	RU917 (=ATCC 27917)	Rumen de bovin, fèces de porcelet
<i>B. magnum</i> (SCARDOVI et ZANI., 1974)	RA3 (=ATCC 27540)	Fèces lapin
<i>B. pullorum</i> (TROVATELLI et al. 1974)	P145 (=ATCC 27685)	Fèces poule
<i>B. suis</i> (MATTEUZI et al. 1971)	SU859 (=ATCC 27533)	Fèces porcelet

<i>B. coryneforme</i> (SCARDOVI et TROVATELLI, 1969)	C215 (=ATCC 25911)	Abeille
<i>B. asteroides</i> (SCARDOVI et TROVATELLI, 1969)	C51 (=ATCC 25910)	Abeille
<i>B. indicum</i> (SCARDOVI et TROVATELLI, 1969)	C410 (=ATCC 25912)	Abeille
<i>B. gallinarum</i> (WATABE et coll, 1983)	Ch206-5 (=ATCC 33777)	Fèces de poule
<i>B. ruminantium</i> (BIAVATI et MATTARELLI, 1991)	ATCC 49390	Rumen de bovin
<i>B. merycicum</i> (BIAVATI et MATTARELLI, 1991)	ATCC 49391	Rumen de bovin
<i>B. saeculare</i> (BIAVATI <i>et al.</i> , 1991)	ATCC 49392	Fèces de lapin

---

**Origine environnementale**

---

<i>B. minimum</i> (SCARDOVI et TROVATELLI, 1974)	F392 (=ATCC 27538)	Eaux usées
<i>B. subtilis</i> (SCARDOVI et TROVATELLI, 1974)	F395 (=ATCC 27537)	Eaux usées

---

obtenus par les différents auteurs, sur la répartition des bifidobactéries au sein de la flore fécale sont souvent assez contradictoires.

## II-ÉCOLOGIE DES BIFIDOBACTERIES

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 dans les fèces de poule (*B. pullorum*, *B. gallinarum*) (Scardovi et Trovatelli, 1969).

Chez l'Homme, les bifidobactéries sont inexistantes au niveau de l'estomac, puis elles augmentent progressivement tout au long de l'axe digestif, pour se retrouver essentiellement au niveau du gros intestin (Hawsworth *et al.*, 1971). 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). Dans les cas pathologiques, il semble que les bifidobactéries se comportent plus comme des bactéries opportunistes que des bactéries pathogènes.

Enfin, les eaux résiduaires sont riches en bifidobactéries (Bourne *et al.*, 1978).

Notre étude portant sur les bifidobactéries humaines, nous avons retracé l'implantation et l'évolution de cette flore chez l'Homme et son influence sur le bon fonctionnement du tube digestif.

### A-ÉTABLISSEMENT DE LA FLORE BIFIDE CHEZ LE NOUVEAU-NE

Le système digestif du fœtus est stérile, mais à la naissance ou peu après, il acquiert la microflore caractéristique de l'espèce par contact avec la mère et l'environnement : le colon dès 48 heures après la naissance contient de  $10^9$  à  $10^{10}$  bactéries par gramme de selle (Mitsuoka et Hayakawa, 1972; Bezirtzoglou, 1985; Moreau *et al.*, 1986). Les bifidobactéries constituent une part importante de la flore normale du colon chez l'Homme et apparaissent quant à elles entre le troisième et le cinquième jour après la naissance (Mitsuoka et Hayakawa, 1972). Le mode de naissance, le type d'alimentation, l'environnement et l'individu influencent ce processus.

## 1-Mode de naissance

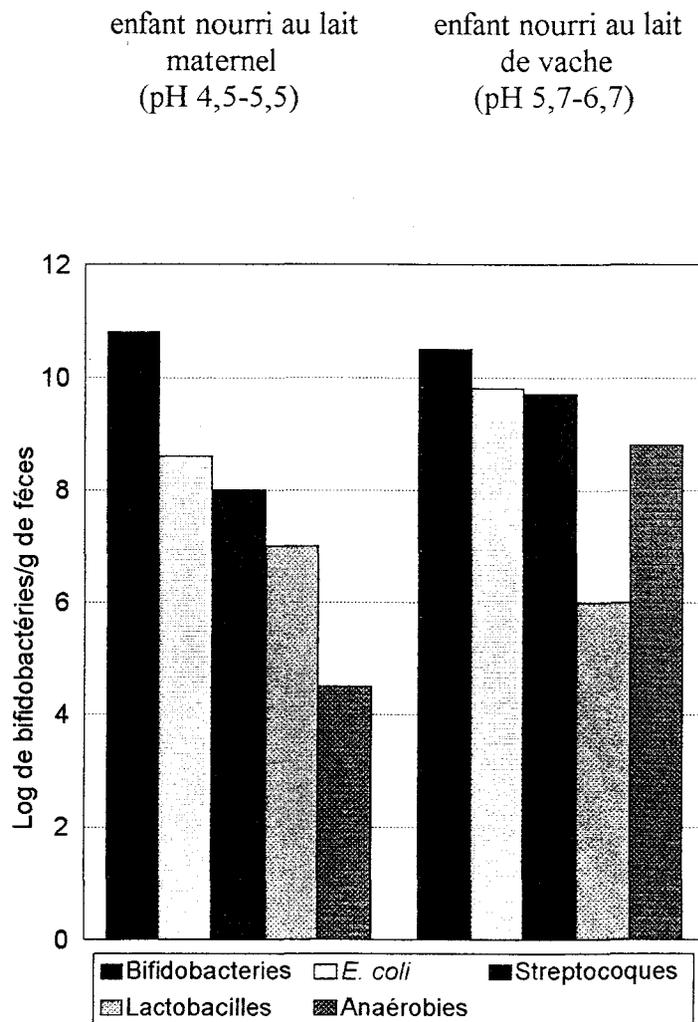
Dans le cas d'une naissance par voie basse, l'enfant est contaminé au contact de la flore vaginale ou fécale de la mère. La flore bifide s'installe au bout de la première semaine (Mitsuoka et Hayakawa, 1972; Bullen *et al.*, 1977; Yoshioka *et al.*, 1983, 1984; Moreau *et al.*, 1986). Elle constitue dans ces conditions, la population la plus importante de la flore fécale  $10^{10}$  à  $10^{11}$  bifidobactéries par gramme de fèces. Chez les enfants nourris au sein, il y a moins de 1% de lactobacilles, d'entérocoques et de coliformes; les *Bactéroïdes* et les *Clostridies* sont totalement absents (Rasic et Kurmann, 1983).

Dans le cas d'une naissance par césarienne, il faut attendre deux semaines avant que la flore bifide ne soit complètement installée (Bezirtzoglou, 1985), l'implantation est encore plus longue dans le cas d'enfants nés prématurément (5 à 6 semaines). Dans ces deux derniers cas, l'allaitement maternel ne favorise pas une apparition et une implantation plus rapide des bifidobactéries.

## 2-Alimentation

Il semble difficile, à première vue, d'affirmer l'influence de l'allaitement maternel dans l'implantation des bifidobactéries au niveau de la muqueuse intestinale. Comme le montre la figure 5 page 31, le taux de bifidobactéries n'est pas significativement différent dans le cas d'une alimentation au lait de vache, par rapport à une alimentation au sein. Il n'y a pas non plus de différences de prolifération entre les différentes souches de bifidobactéries (Mitsuoka, 1984). Il a cependant été mis en évidence que l'alimentation pouvait sélectionner une espèce au niveau du tractus intestinal ( Neut *et al.*, 1981; Yuhara *et al.*, 1983; Benno *et al.*, 1984; Biavati *et al.*, 1984). On peut toutefois noter une augmentation des coliformes, des streptocoques et de la flore anaérobie globale dans le cas d'une alimentation artificielle (figure 5, page 31).

La notion de facteur bifidigène perd ici de son importance depuis que Petschow et Talbott en 1991, ont montré que les deux types d'alimentation n'entraînaient aucune différence significative dans la répartition des différentes espèces de bifidobactéries (*B. infantis*, *B. breve*, *B. longum*, *B. bifidum*). Benno *et al.* (1985) ont d'autre part observé qu'un déficit en vitamine K chez l'enfant s'accompagne d'une diminution des bifidobactéries.



**Figure 5 : Influence du type d'allaitement sur la composition de la flore fécale du nourrisson selon Mitsuoka et Kaneuchi, 1977.**

## B-ROLE DE LA FLORE BIFIDE CHEZ L'ENFANT ET EVOLUTION CHEZ L'ADULTE

Les bifidobactéries constituent une part importante de la flore colique infantile. On observe une sélection des espèces en fonction de l'âge : si *B. infantis*, *B. breve*, *B. longum* var b et *B. bifidum* var b ne se rencontrent que chez le nourrisson (Biavati *et al.*, 1984), dès le sevrage, ces espèces sont remplacées par d'autres bifidobactéries (*B. longum*, *B. adolescentis*, *B. catenulatum*) (Tableau II, page 33). Le sevrage s'accompagne également d'une apparition et d'une prolifération des entérobactéries ainsi que d'une augmentation des genres *Bacteroides* et *Clostridium*. Ensuite, les bifidobactéries ont tendance à diminuer avec l'âge, surtout après 65 ans, au profit des *Clostridium*, *Lactobacillus*, *E. coli* et *Streptococcus* (Figure 6, page 33) (Stark et Lee, 1982; Benno *et al.*, 1984). De par leur importance, les bifidobactéries ne représentent plus chez l'adulte, que le deuxième ou troisième groupe bactérien de la flore intestinale. L'équilibre de cette flore est précaire, il peut être modifié par le stress ou par des modifications brutales de régime alimentaire (Lugovskaia et Ladodo, 1984; Neut *et al.*, 1985).

Le rôle des bifidobactéries a surtout été envisagé chez l'enfant, d'une part à cause de leur importance dans la flore intestinale et d'autre part à cause de leur influence sur l'état de bonne santé de l'hôte. Les rôles bénéfiques des bifidobactéries résulteraient de la combinaison de plusieurs activités biologiques. Le taux élevé de bifidobactéries empêcherait la colonisation du tractus digestif par les germes pathogènes en créant une compétition vis à vis des substances nutritives et par saturation des sites d'attachement présents à la surface épithéliale. La mortalité liée aux gastro-entérites est nulle dans le cas où la flore bifide est installée (Robinson, 1951). On sait également que *C. perfringens* ne se maintient pas chez le nourrisson en présence de *B. bifidum* (Bezirtzoglou, 1985).

Rasic et Kurmann, en 1983, émettent l'hypothèse que la flore bifide pourrait intervenir dans les mécanismes de protection contre les diarrhées à rotavirus.

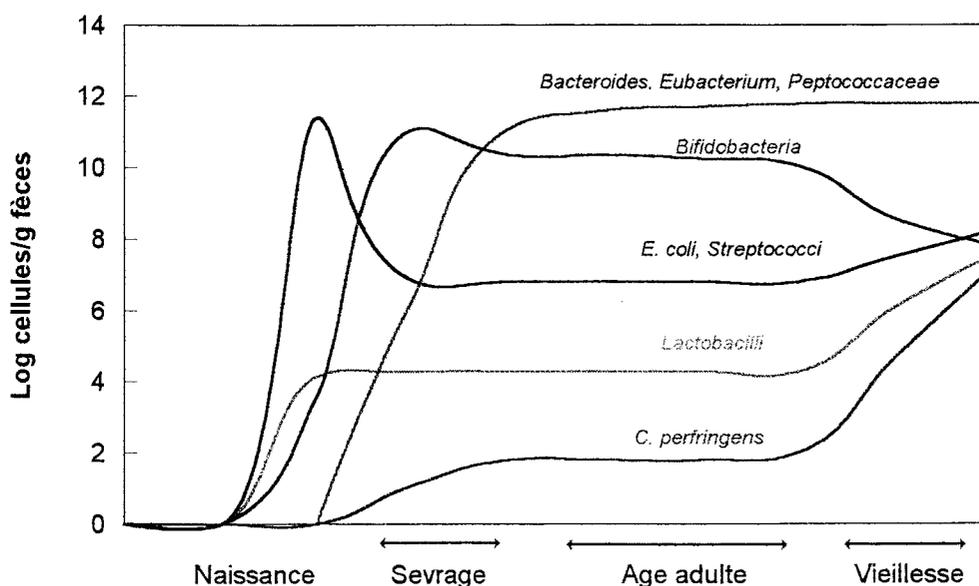
Les bifidobactéries produisent des acides lactiques et acétiques et en plus faible quantité, de l'acide formique. La diminution du pH à l'intérieur du colon inhiberait la croissance des bactéries à Gram-négatif (Poupard *et al.*, 1973; Tamura, 1983). La production de substances antimicrobiennes (lysozyme) ou analogues aux antibiotiques (bactériocines) pourrait également intervenir dans la protection intestinale (Minagawa and Okada, 1974), mais ces données restent encore à vérifier.

Contrairement à ce qu'on a pu penser, il semblerait bien que la flore bifide joue un rôle important dans la défense des muqueuses intestinales chez l'enfant, rôle qu'elle doit certainement aussi jouer chez l'adulte et chez le vieillard. Ainsi, les bifidobactéries ne sont pas

**Tableau II : Evolution de la fréquence des espèces de *Bifidobacterium* en fonction des différents groupes d'âge (en pourcentage de bactéries isolés de la flore fécale par rapport à la population testée) selon Mitsuoka et Kaneuchi (1977)\*.**

Espèces	Nourrissons (1 mois)		Enfants 2 à 4 ans (20)	Adultes 20 à 40 ans (26)	Personnes âgées >65 ans (14)
	avec allaitement				
	artificiel (13)	maternel (10)			
<i>B. bifidum</i>	39	30	30	19	43
<i>B. infantis</i>	23	0	0	0	0
<i>B. breve</i>	62	60	15	0	0
<i>B. longum</i>	15	30	55	54	22
<i>B. adolescentis</i>	15	10	95	81	64

\* : Tests phénotypiques  
( ) nombre de cas examinés



**Figure 6 : Différences entre les espèces bactériennes retrouvées dans les fèces, selon l'âge des personnes selon Mitsuoka et Hayakawa, 1972**

de simples témoins de la bonne santé de l'intestin mais les effets bénéfiques de ces derniers semblent bien réels.

Dans une revue générale, Mitsuoka (1990) fait un inventaire des propriétés bénéfiques engendrées par une flore fécale riche en bifidobactéries. Il note ainsi :

- une diminution des bactéries putréfiantes-une diminution de l'ammoniaque intestinale
- une diminution des activités glucuronosidasique, tryptophanasique et nitroréductasique.
- une diminution de la constipation

De part leur action bénéfique, il est intéressant d'envisager l'utilisation des bifidobactéries en tant que probiotiques.

## **LES PROBIOTIQUES**

### **I-DEFINITION**

Les probiotiques sont des préparations contenant des microorganismes et leurs métabolites, utilisés comme additifs alimentaires, et qui affectent de façon bénéfique l'organisme hôte. Dans la majorité des cas, ce sont des microorganismes qui seront capables de croître et (ou) de fonctionner dans le tractus intestinal comme les lactobacilles, les streptocoques et les bifidobactéries. La compréhension du mode d'action des bifidobactéries à titre de probiotique repose sur la connaissance de l'écologie microbienne dans le tractus intestinal.

Dans cet environnement complexe, il existe plusieurs modes d'interaction entre les différents microorganismes ainsi qu'entre les microorganismes et l'organisme hôte. La microflore du tractus intestinal, la présence de mucus et d'IgA sécrétoires aident l'organisme à lutter contre les infections (Collins et Carter, 1978; Hentges, 1983). Depuis longtemps, les produits de fermentation ont eu la réputation de posséder des propriétés quasi magiques de bonne santé ( Metchnikoff, 1907) mais depuis deux décennies, des études ont porté sur les propriétés des microorganismes en cause : les bactéries lactiques. Les bactéries lactiques présentes dans l'intestin humain et animal sont introduites via les produits laitiers fermentés, la nourriture et les suppléments nutritifs contenant des bactéries viables. Ces bactéries constituent une partie intégrante de la microécologie gastrointestinale de l'organisme en bonne santé et sont impliquées dans le métabolisme de l'hôte.

Une fois que la flore intestinale est stabilisée, elle peut être affectée tant par des facteurs de la diète que de l'environnement dont les plus importants sont l'hygiène excessive, la thérapie aux antibiotiques et le stress. Les traitements antibiotiques *per os* suppriment cette microflore protectrice, même après son acquisition, laissant les pathogènes résistants aux drogues survivre (Smith et Tucker, 1975). Les effets d'une telle thérapie se traduisent par des diarrhées et un syndrome inflammatoire qui peuvent être réduits par l'administration de préparations contenant des cellules vivantes de lactobacilles et de bifidobactéries (Tomoda *et al.*, 1983). Cependant, les antibiotiques peuvent aussi faciliter la colonisation de l'intestin par les bactéries probiotiques, en détruisant la microflore compétitive (Bhattacharya et Majunder 1983; Gorbach *et al.* 1988). Les stress : physique, émotionnel et diététique conduisent généralement à la réduction du nombre de lactobacilles et à la croissance des coliformes (Tannock, 1983).

L'utilisation de probiotiques est valable à chaque fois que l'équilibre de la microflore intestinale est rompu, l'organisme lui-même étant incapable de retourner à la normale.

Un des facteurs motivateurs les plus importants pour l'utilisation des microorganismes comme probiotiques en nutrition humaine et animale, serait le remplacement des antibiothérapies. Cependant, contrairement à ces derniers les probiotiques ne tuent pas les autres bactéries mais entrent en compétition avec elles, inhibent leur croissance et finalement conduisent à la restauration de l'équilibre biologique.

## **II-MODE D'ACTION DANS LE TUBE DIGESTIF**

La présence d'organismes viables et actifs au moment de la consommation requiert d'abord une certaine stabilité des microorganismes durant la préparation et l'entreposage préalable à la consommation des probiotiques. Ensuite, la capacité des souches bactériennes à coloniser le tube digestif découle de propriétés telles que l'adhésion, la résistance à l'acidité gastrique, à l'action de la bile, le caractère anaérobie et la possibilité de l'utilisation concurrentielle des composants nutritifs.

La compétition pour l'adhésion sur la paroi intestinale est selon certains auteurs un mécanisme significatif de protection de l'organisme contre l'infection et joue un rôle essentiel pour la reconstruction et la régulation de l'équilibre entre les populations microbiennes dans le tractus intestinal. Plusieurs publications ont révélé l'élimination d'effets négatifs de la thérapie antibiotique par l'administration simultanée ou postérieure de cultures probiotiques d'espèces de *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* (Cole et Fuller 1984, Colombel *et al.* 1987; Gorbach *et*

*al.* 1987). Une diversification des propriétés adhésives selon les souches de la même espèce et l'influence du milieu et des paramètres de culture sur ces propriétés ont été montrées (Fuller 1975; Conway *et al.*, 1987). Selon Fuller (1975), l'adhésion est aussi une propriété spécifique de l'hôte. Les organismes utilisés à titre de probiotiques, étant capables de survivre et de croître dans l'intestin (Edens *et al.* 1991), peuvent exercer un contrôle des microorganismes indésirables tout au long de la croissance de l'hôte.

### **III-LES BIFIDOBACTERIES EN TANT QUE PROBIOTIQUES**

Les bifidobactéries ne faisant pas partie de la flore habituelle du lait, il a fallu adapter les procédés de fabrication afin d'y favoriser leur croissance et assurer leur survie pendant toute la durée de conservation du produit.

#### **A-TRANSIT GASTRIQUE ET INTESTINAL**

L'intestin grêle humain contient environ  $10^5$  cellules bactériennes par gramme de contenu intestinal, le côlon en abrite  $10^{11}$  cellules/g (Bernier *et al.*, 1988). Il est probable que pour exercer un effet probiotique réel, les bactéries doivent arriver vivantes et en nombre suffisant dans les intestins  $10^6$  cellules/g (Samona et Robinson, 1991) ou  $10^7$  cellules/g (Bouhnik, 1993), ou bien elles doivent y adhérer (Samona et Robinson, 1991) ou s'y implanter et se multiplier (Ducluzeau et Raibaud, 1979). Pour exercer un effet, les bifidobactéries apportées par un lait fermenté doivent donc résister aux conditions acides de l'estomac pendant 90 min, temps moyen de vidange gastrique pour les produits laitiers, et résister à la bile afin de transiter dans l'intestin grêle. Un grand nombre de bifidobactéries présent dans des laits fermentés du commerce survivent au transit intestinal bien que toutes les souches ne résistent pas de la même manière (Berrada *et al.*, 1991; Marteau *et al.*, 1992; Pochart *et al.*, 1992; Bouhnik *et al.*, 1992). Une étude réalisée chez des volontaires a pu démontrer que 30% des bifidobactéries présentes dans un lait fermenté se retrouvaient dans les fèces des sujets (Bouhnik *et al.*, 1992). Ce résultat est en adéquation avec le taux de 23,5% à 37,5% de bifidobactéries recouvré dans l'iléon d'autres volontaires (Marteau *et al.*, 1992; Pochart *et al.*, 1992).

## B-LES EFFETS SUR LA FLORE INTESTINALE

Des numérations fécales ont montré une modification de la population intestinale après ingestion de lait fermenté au *Bifidobacterium* : une augmentation de bactéries fécales de 20 à 8000 fois selon les auteurs (Bouhnik *et al.*, 1992; Benno et Mitsuoka, 1992; Ballongue *et al.*, 1993). D'après l'étude de Benno et Mitsuoka, 1992, l'ingestion de  $5 \cdot 10^9$  bifidobactéries 3 fois par jour pendant 5 semaines sous forme de poudre lyophilisée, modifierait le profil de la flore fécale humaine : le nombre de bactéries fécales reste inchangé mais la proportion relative de bifidobactéries augmente tandis que celle des *bactéroïdes* et des *clostridies* diminue ainsi que le pH fécal. Il reste à découvrir comment les bifidobactéries affectent la microflore des intestins. L'augmentation des bifidobactéries pourrait être due aux bactéries ingérées (Bouhnik *et al.*, 1992) ou à leur implantation (Ballongue *et al.*, 1993). Les résultats sur cette dernière hypothèse sont assez contradictoires, d'après Bouhnik (1993) les bifidobactéries administrées oralement ne pourraient pas s'implanter dans l'intestin même dans des conditions favorables à la colonisation. D'après Benno et Mitsuoka (1992), même si on observe une augmentation de la population de bifidobactéries lors de l'ingestion de lait fermenté, celle-ci retrouve son niveau primitif 1 à 2 semaines après l'arrêt de la consommation.

Le mécanisme permettant aux bifidobactéries de modifier la flore intestinale n'a pas encore été clairement défini.

## C-LES EFFETS PHYSIOLOGIQUES

Les différentes répercussions sur l'organisme d'une quantité importante de bifidobactéries se classent en deux grandes catégories : les effets immunologiques et les effets sur la microflore (tableau III, page 38).

Les effets immunologiques ont été clairement démontrés *in vitro* (Kada-Oka *et al.*, 1991; Yasui *et al.*, 1992), mais il a également été possible d'observer une augmentation significative de l'immunité humorale lors d'une étude réalisée sur 15 volontaires (De Simone *et al.*, 1992). Cependant les effets immunologiques *in vivo* sont difficiles à démontrer statistiquement, en raison de la complexité des réponses immunitaires.

Les effets sur la microflore intestinale ont été clairement démontrés chez les animaux et les êtres humains. Ces effets se classent en deux catégories : ceux mesurés indirectement par le transit intestinal (Tanaka et Shimosaka, 1982; Colombel *et al.*, 1987; Hotta *et al.*, 1987; Grimaud *et al.*, 1992) et ceux mesurés directement par la numération des bactéries et par le

**Tableau III : Résultats expérimentaux des effets exercés par les bifidobactéries.**

\*Différence statistiquement significative entre le groupe traité et le groupe contrôle (H. Symons, 1994, Les Bifidobactéries, World Newsletter Danone n°3)

Organisme	Test	Effets	Contrôle	Forme
<i>B. longum</i> BL2928	<i>in vitro</i> phagocytose	↗ production d'IL-1 ↗ cytotoxicité	latex	cellules tuées à la chaleur, lyophilisées
<i>B. breve</i> 4064	<i>in vivo</i>	↗ IgA sécrétoires	<i>B. breve</i> Ka-6	
<i>B. breve</i> 4064	<i>in vivo</i> (souris)	↗ anticorps spécifique-antigène* (toxine du choléra)	<i>B. breve</i> Ka-6	suspension aqueuse (tube stomacal)
<i>B. bifidum</i> et <i>L. acidophilus</i>	<i>in vivo</i> (15 personnes)	↘ inflammation chronique du côlon sigmoïde* ↗ immunité humorale*	placebo	lyophilisé
<i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>in vivo</i> (15 personnes)	↘ fréquence des selles dans la diarrhée persistante	-	?
<i>B. longum</i>	<i>in vivo</i> (5 personnes)	↘ population de clostridies ↘ NH3 dans les fèces ↘ β-glucuronidase dans les fèces ↘ pH dans les fèces	mêmes personnes avant et après bifidus	bactéries lyophilisées
<i>B. longum</i>	<i>in vivo</i> (souris)	↗ durée de vie* ↘ créatinine*	lait écrémé, yoghourt	lait fermenté
<i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>in vivo</i> (chez l'homme)	↗ fréquence des selles (chez des personnes âgées alitées)	mêmes personnes avant et après bifidus	lait fermenté
<i>B. longum</i>	<i>in vivo</i> (10 personnes)	↘ effets gastro-intestinaux induits par l'érythromycine	yoghourt (sans bifidobactéries)	lait fermenté
<i>Bifidobacterium</i> spp. et <i>L. acidophilus</i>	<i>in vivo</i> (6 personnes)	↘ nitroréductase ↘ glucuronidase	mêmes personnes avant et après bifidus	lait fermenté
<i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>in vivo</i> (chez l'homme)	survie pendant le transit intestinal	-	lait fermenté
<i>B. longum</i> BB536	<i>in vivo</i> (48 personnes)	↘ population de clostridies ↘ population de bactéroïdes ↘ population de coliformes	<i>B. longum</i> ATCC 15707	lait fermenté
<i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>in vivo</i> (60 personnes)	↘ temps de transit colonique*	lait fermenté au bifidus pasteurisé	lait fermenté

dosage de l'activité des enzymes (Marteau *et al.* 1990; Suzuki *et al.*, 1991; Benno et Mitsuoka, 1992; Bouhnik, 1993; Ballongue *et al.*, 1993).

De nombreux articles décrivent les effets *in vivo* de l'ingestion d'une grande quantité de bifidobactéries vivantes chez l'animal et l'être humain, mais peu d'études se sont déroulées en double-aveugle, sur un nombre suffisant de personnes et avec un groupe témoin approprié pour permettre d'aboutir à des différences statistiquement significatives. Récemment, on a observé sur 60 volontaires en bonne santé, que l'ingestion 3 fois par jour, de 125g de lait fermenté aux bifidobactéries, diminuait le temps de transit intestinal, sans s'écarter pour autant des limites physiologiques normales (Grimaud *et al.*, 1992). Cet effet sur le côlon sigmoïde est statistiquement significatif chez les femmes ayant un régime alimentaire normal. Il est possible que la modification de la flore intestinale, provoquée par l'ingestion d'une grande quantité de bifidobactéries, soit responsable de cet effet physiologique.

## D-CONCLUSION

Il a été démontré que quelques souches de bifidobactéries, sélectionnées pour leur résistance à l'acidité gastrique et à l'action des sels biliaires, survivent au transit intestinal et atteignent le côlon en quantité significative. L'ingestion régulière d'une grande quantité de bactéries vivantes peut influencer la microflore intestinale endogène. On retrouve alors des effets physiologiques qui se rapprochent de ceux naturellement observés chez un individu possédant une flore fécale riche en *B. bifidum*.

L'ingestion de cette flore exogène bénéfique aurait pour but de recréer artificiellement la composition fécale d'un individu en bonne santé. Bien que les études sur la consommation de bifidobactéries vivantes soient nombreuses, leurs résultats sont encore difficiles à interpréter, d'autres part, des études plus nombreuses doivent être entreprises pour découvrir le mécanisme qui permet à ces bactéries d'exercer leurs effets.

## MECANISME GENERAL DES INTERACTIONS ADHESINE-RECEPTEUR CHEZ LES BACTERIES

Nous avons vu précédemment que la présence des bifidobactéries protège l'intestin contre les infections bactériennes et renforce les défenses de l'organisme-hôte. Il serait donc très profitable pour le bien-être de l'homme à tous âges, de comprendre les mécanismes régissant l'implantation des bifidobactéries à la surface de l'épithélium intestinal.

## I- STRUCTURE DES ADHESINES

Les adhésines représentent une vaste famille regroupant toutes les structures de la surface bactérienne (protéines, glycoprotéines, lipides, polysaccharides) permettant à la bactérie d'adhérer à la surface cellulaire de l'hôte.

### A- ADHESINES DE NATURE PROTEIQUE

Un certain nombre d'adhésines sont organisées en filaments protéiques hérissant la surface bactérienne. Ces adhésines appelées fimbriae ou pili sont surtout présentes chez les bactéries à Gram négatif. Elles sont formées de sous-unités protéiques (piline ou fimbrine) de 15 à 26 kDa suivant les espèces. Des adhésines protéiques non fibrillaires de la membrane bactérienne peuvent aussi interagir avec l'hôte.

Ces adhésines possèdent des activités de type lectine, de spécificités très diverses. L'adhésine de type lectine de *Bacteroides fragilis* reconnaît spécifiquement la D-glucosamine et la D-galactosamine (Guinet *et al.*, 1986). La fixation de *Helicobacter pylori* à l'épithélium gastrique humain s'effectue par une reconnaissance de l'antigène de groupe sanguin Lewis<sup>b</sup> (Borén *et al.*, 1993). La lectine de *Entamoeba histolytica* (170 kDa) reconnaît spécifiquement les sucres simples, galactose et N-acétyl-D-galactosamine (Ravdin *et al.*, 1985).

Des protéines bactériennes sécrétées sont aussi décrites comme adhésines. Ainsi, une adhésine extracellulaire, fortement sensible à l'hydrolyse trypsique, a été retrouvée dans le surnageant de culture de trois souches de lactobacilles, *L. acidophilus* RC-14, *L. plantarum* RC-20 et *L. casei* RC-17 (Reid *et al.*, 1993).

### B- ADHESINES DE NATURE NON PROTEIQUES

#### 1- L'acide lipotéichoïque

L'acide lipotéichoïque (LTA) est un composant membranaire de la plupart des germes à Gram positif. La molécule est composée d'une part de l'acide téichoïque qui est un polymère composé de résidus de glycérol reliés par des liaisons phosphodiester et d'autre part d'une "queue" lipidique. Le glycérol peut être substitué par des acides aminés ou par des chaînes glycaniques comprenant du glucose, de la N-acétylglucosamine ou de la N-acétylgalactosamine. La nature et l'étendue des substitutions dépendent des espèces bactériennes

Les acides lipoteichoïques de la paroi de *Bifidobacterium bifidum* se fixeraient spécifiquement aux récepteurs de l'épithélium colique humain. Cette interaction se ferait par l'intermédiaire des liaisons esters des acides gras de la partie lipidique (Op den Camp *et al.*, 1985a).

## 2- La capsule exopolysaccharidique

De nombreuses eubactéries à Gram positif ou négatif possèdent à leur surface une capsule polysaccharidique composée d'unités saccharidiques répétitives et le plus souvent chargées négativement. Cette capsule représente une gangue protectrice contre les anticorps, la phagocytose ou les antibiotiques (Costerton *et al.*, 1981). L'intervention de l'exopolysaccharide comme adhésine a été plusieurs fois discutée mais n'a jamais été démontrée. En 1982, Sato *et al.*, observent que la capsule polysaccharidique de *Bifidobacterium bifidum* participerait à l'adhérence de la bactérie à la muqueuse intestinale. De leur côté, Costerton *et al.* (1981) montrent que l'exopolysaccharide permet non seulement l'adhésion de la bactérie à l'hôte mais aussi l'agrégation des bactéries entre elles pour former des microcolonies.

L'exopolysaccharide peut être considéré comme une adhésine interagissant avec son hôte de manière non spécifique et faisant intervenir des liaisons ioniques ou hydrophobes. On voit que le terme adhésine a une signification très vaste et qu'il ne se limite pas qu'aux structures bactériennes reconnaissant spécifiquement un site récepteur.

## C- EXPRESSION DES ADHESINES

L'expression des adhésines peut être modulée par les conditions de croissance *in vivo* et *in vitro*. Ainsi les adhésines des souches entérotoxiques de *E. coli* K99 et K88 s'expriment *in vivo* dans l'intestin et *in vitro* à 37°C; elles sont produites en moins grand nombre à 18°C (Isaacson, 1983). Il est aussi montré que les bactéries invasives perdent l'expression de leurs fimbriae lorsqu'elles se retrouvent dans le sang (Arp, 1988). On voit donc que l'expression des adhésines de surface est modulée par l'environnement dans lequel se trouve la bactérie.

L'apport récent de la biologie moléculaire a permis de définir un modèle complexe de régulation susceptible d'expliquer ces phénomènes d'adaptation. Le modèle présenté par Ronson *et al.* (1987) fait intervenir une protéine sensible aux stimuli de l'environnement ("sensor component") qui relaie les informations à une protéine régulatrice ("regulatory component") activant les gènes nécessaires à la croissance dans un environnement donné. Ce

système permet de relier la présence ou l'absence de certaines protéines membranaires à des conditions de culture particulières (DeVault *et al.*, 1989). Le schéma proposé par l'équipe de Ronson semble une hypothèse intéressante pour expliquer l'expression des adhésines en fonction de l'environnement.

## **II-LES RECEPTEURS DE LA SURFACE INTESTINALE**

Les cellules épithéliales, le glycocalyx et les sécrétions qui constituent la barrière de protection des tissus sous-jacents sont autant de sites de fixation potentiels aussi bien pour la flore indigène que pour les germes pathogènes. La nature moléculaire des récepteurs reconnus par les adhésines bactériennes est très variée. Grâce à leur abondance au sein des muqueuses, les structures glycaniques appartenant soit à des glycolipides, soit à des glycoprotéines sont préférentiellement reconnues par les adhésines bactériennes, mais des protéines peuvent également jouer le rôle de récepteur.

### **A-LES RECEPTEURS GLYCANNIQUES**

#### **1-Les glycolipides**

Les glycolipides sont des molécules amphipathiques formées d'une partie lipidique (céramide) ancrée dans la membrane plasmique et d'une partie glycanique orientée vers l'extérieur de la cellule et accessible aux toxines ou aux adhésines bactériennes. Ces sites glycaniques sont reconnus, par exemple, par certaines bactéries responsables de pneumonies (Krivan *et al.*, 1987), ou par la souche d'*E. coli* responsable d'infections du tractus urinaire (Bock *et al.*, 1985).

#### **2-Les glycoprotéines**

Des glycoprotéines de haut poids moléculaire (les mucines), synthétisées et sécrétées par les cellules épithéliales des muqueuses sous-jacentes (Gallagher and Corfield, 1978) et des glycoprotéines intrinsèques à la membrane de la surface colique recouvrent le tractus intestinal sous forme d'une substance très visqueuse : le mucus. L'aggrégation des mucines forme un gel qui en plus du rôle de lubrification de la surface colique, joue un rôle aussi bien en protégeant le tractus intestinal contre les agressions physiques et chimiques qu'en résistant aux invasions des bactéries pathogènes. La caractérisation des structures des oligosaccharides des mucines est très intéressante, celles-ci se retrouvent sur certaines glycoprotéines circulantes ou sur

certain glycolipides. On peut également établir une relation entre la structure des mucines et la physiologie et la pathologie du tractus intestinal.

#### a-O-glycannes de type mucine

Les oligosaccharides représentent environ 70% en poids des mucines. Ils sont répartis en plusieurs centaines de chaînes latérales rattachées à un axe peptidique par une liaison O-glycosidique entre la GalNAc de l'extrémité terminale réductrice des chaînes et les groupements hydroxyles de la sérine ou de la thréonine (Carlson, 1977). La taille des chaînes latérales varient selon l'origine de la sécrétion, de 2 à 5 sucres pour des chaînes simples (mucus sous/maxillaire de Mouton et de Porc) et de 16 à 19 sucres pour des chaînes plus complexes (mucus gastrique de Porc et mucus de kyste ovarien humain) (Allen, 1983), elle peut également évoluer au cours de la biosynthèse et sous l'effet de l'hydrolyse par des glycosidases.

Outre la N-Acétylgalactosamine impliquée dans la liaison sucre-protéine, les O-glycannes de type mucine contiennent communément de la N-Acétylglucosamine, du galactose, du fucose et des acides sialiques divers. Gal, GlcNAc peuvent en outre se trouver sous forme sulfatée, et de ce fait, ils contribuent avec l'acide sialique à l'acidité de beaucoup d'oligosaccharides de type mucine.

En dépit de leur complexité apparente due à une grande variabilité structurale, les chaînes O-glycanniques de type mucine se composent de trois régions distinctes (Hounsell and Feizi, 1982) (figure 7, page 45), à savoir:

--le **noyau** ou "core" incluant la liaison avec l'axe peptidique,

Il compte huit types de structures dont l'élément de base est toujours GalNAc- $\alpha$ -Ser/Thr.

-le **squelette** ou "backbone", région charnière qui peut être linéaire ou branchée,

L'addition de résidus de galactose et de N-acétylglucosamine sur les cores conduit à la formation du squelette des O-glycannes organisé en 2 types de séquences (Watkins, 1980):

**$\beta$ Gal 1-3GlcNAc (type 1) et  $\beta$ Gal 1-4GlcNAc (type 2)**

-la **périphérie**, région terminant la chaîne glycannique

Les substitutions rencontrées sur les séquences  $\beta$ Gal 1-3GlcNAc et  $\beta$ Gal 1-4GlcNAc possèdent les activités de groupe sanguin ABH et Lewis .

*Yersinia enterocolitica* adhère spécifiquement à la partie glycannique (Gal, GalNac) des mucines intestinales humaines et de Lapin (Mantle and Husar, 1993). Keusch *et al.* (1986) ont démontré que la pathogénicité de *Shigella dysenteriae* était liée à une reconnaissance spécifique du motif saccharidique GlcNAc liée en  $\beta$ 1-4.

## b-L'axe peptidique des mucines

La première mise en évidence de l'hétérogénéité de l'axe peptidique des mucines est réalisée en 1973 par Degand sur plusieurs mucines contenues dans un kyste ovarien. Cette hétérogénéité dans la composition en acides aminés se retrouve également dans des mucines coliques et intestinales. L'axe polypeptidique serait constitué d'une alternance de régions très fortement glycosylées, hydrophiles, couvertes de centaines de chaînes glycaniques très hétérogènes et de régions dites "nues", moins glycosylées, sensibles à l'hydrolyse protéolytique (Allen, 1983) (figure 8, page 45). Les différentes sous-unités glycoprotéiques sont reliées par des ponts disulfures au niveau des régions protéiques non glycosylées (Allen, 1983, Carlstedt *et al.*, 1985). Ces régions non glycosylées possèdent des propriétés hydrophobes qui disparaissent après traitement des mucines par les protéases (Codington *et al.*, 1975).

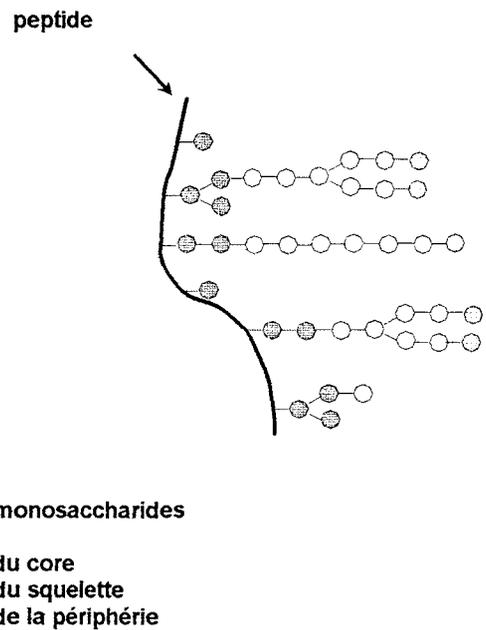
Les mucines sont des molécules très interactives et cette propriété d'interagir avec l'environnement chimique et cellulaire est jusqu'ici essentiellement attribuée à la fraction glycanique, qui peut être considérée comme une résine biologique, un piège moléculaire à l'égard de divers constituants protéiques ou lipidiques, un support sérologique, une barrière bactériostatique (Ramphal *et al.*, 1989).

## B-LES RECEPTEURS PROTEIQUES

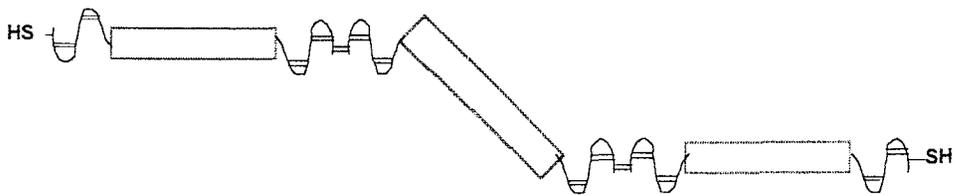
Les protéines extracellulaires responsables de l'adhésion cellulaire semblent également jouer un rôle majeur dans l'interaction entre l'hôte et la bactérie.

Dans le cas de la fibronectine, au moins trois mécanismes distincts d'adhésion de germes à Gram positif ont été décrits (Ceri *et al.*, 1988): *Streptococcus pyogenes* se fixe à la fibronectine par l'intermédiaire de l'acide lipotéichoïque, *Staphylococcus aureus* adhère à la partie N-terminale de cette protéine par l'intermédiaire d'une adhésine de surface, et enfin une association de type lectine-sucre a été décrite entre *S. aureus* et la partie glycanique de la fibronectine.

Certaines glycoprotéines de la membrane basale se trouvent anormalement exposées lors de l'altération des cellules épithéliales. Une de ces glycoprotéines, la laminine, est capable de fixer *E. coli* (Speziale *et al.*, 1982), *S. aureus* (Lopes *et al.*, 1985) et divers streptocoques (Ceri *et al.*, 1988).



**Figure 7 : Représentation schématique des chaînes glucidiques des glycoprotéines de type mucine (d'après Hounsel et Feizi, 1982).**



**Figure 8 : Représentation schématique de la structure d' un type de mucines (mucines gastriques de Rat d'après Strous et Dekker, 1992).**

□ régions peptidiques O-glycosylées; ~ régions peptidiques non glycosylées, sensibles à l'hydrolyse protéasique, (=) pont disulfure, -SH groupement thiol.

# **Matériels et Méthodes**

## I-CONDITIONS DE CULTURE DE *BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM*

### A- SOUCHES UTILISÉES

Le microorganisme utilisé lors de ce travail est *Bifidobacterium bifidum*. Différentes souches ont été sélectionnées pour les travaux concernant l'adhérence en particulier:

-*Bifidobacterium bifidum* var b AA 2/2, souche sauvage, identifiée selon les critères de MITSUOKA et isolée par C. Romond (UFR de Pharmacie de l'Université de Lille II) à partir de fèces d'enfants nourris au sein.

-*Bifidobacterium bifidum* DSM 20082, souche de collection, espèce d'origine humaine isolée à partir de fèces d'adulte.

-*Bifidobacterium bifidum* C306 souche sauvage, espèce d'origine humaine isolée par C. Romond à partir de fèces d'enfant.

Ces souches nous sont fournies par F. Gavini (INRA de Villeneuve d'Ascq)

### B-COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE

La souche AA 2/2 est cultivée sur un milieu dont la composition est la suivante:

- extrait de levure (5g/l) (Institut Pasteur de Lille)
- bouillon cerveau-coeur (37g/l) (Institut Pasteur de Lille)
- glucose (10g/l)

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

La souche DSM 20082 est cultivée sur un milieu Trypticase-Phytone-Yeast (TPY) dont la composition est la suivante:

-Bio-Trypcase (Biokar)	10 g
-Bio-Soyase (Biokar)	5 g
-extrait de levure (Biokar)	2,5 g
-Tween 80	1 ml
- Hydrogénophosphate dipotassique ( $K_2HPO_4, 3H_2O$ )	2,6 g
-Chlorure de magnésium ( $MgCl_2, 6 H_2 O$ )	0,5 g
-Sulfate de zinc ( $ZnSO_4, 7 H_2O$ )	0,25 g
-Solution de chlorure de fer ( $FeCl_3, 6H_2O$ ) à 0,2%	5ml
-Chlorure de calcium ( $CaCl_2, 2H_2O$ )	0,2 g

-Glucose	5g
-Agar	18g
-Eau distillée	qsp1000ml

Autoclavage 20 minutes à 121°C

Le milieu est réduit par une solution de chlorhydrate de cystéine à 0,5 g/l et ajusté à pH 6,1.

## C-CONDITIONS DE CULTURE

→ Les conditions de fermentation en milieu cerveau-coeur-extrait de levure ont été optimisées par BOUTRY (1989). Elles ont permis d'obtenir des quantités importantes de microorganismes.

Une première préculture de 300 ml est réalisée en flacon durant 24 heures. Après contrôle au microscope, elle est inoculée dans un fermenteur de 6 litres SETRIC dont le milieu a été préalablement autoclavé. La fermentation s'effectue en anaérobiose (sous mélange N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>; 85/15), sous contrôle de température (37°C) et de régulation de pH à 6,0 par addition de soude. La biomasse ainsi obtenue permet d'ensemencer un fermenteur SETRIC de 200 litres.

La culture est arrêtée après 40 heures, soit 10 heures après la fin de la phase exponentielle de croissance, elle est ensuite centrifugée pendant 10 min à 7000g et à 4°C. Le culot cellulaire ainsi obtenu est congelé à -80°C dans un tampon phosphate de sodium 20 mM pH 7,0, contenant du glycérol (10% v/v).

→ La culture en milieu TPY s'effectue sous contrôle de température (39°C) et en anaérobiose (sous mélange N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> ; 80/10/10) :

-soit en fermenteur avec régulation du pH à 6,1 par addition de soude. Dans ces conditions, une préculture de 600 ml, âgée de 16 heures, est alors inoculée dans un fermenteur de 6 litres SETRIC.

-Soit en fioles à pH non régulé. Une préculture de 10 ml, âgée de 16 heures, est inoculée dans 90 ml de milieu.

Le suivi des cultures s'effectue par une lecture de l'absorbance à 550 nm et par une mesure du pH du milieu aux différents temps de culture.

Le culot cellulaire, obtenu après 48h de culture et centrifugation, est conservé par congélation à -80°C dans un tampon phosphate de sodium 20 mM pH 7,0, contenant du glycérol (10% v/v).

## II-ACTIVITÉS ENZYMATIQUES DE *B. BIFIDUM*

L'extrait enzymatique obtenu à partir de *B. bifidum* se prépare de la façon suivante : 6g de cellules bactériennes, lavées trois fois en tampon phosphate de potassium, 10 mM, pH 7,5, sont mises en suspension dans 50 ml du même tampon avant traitement aux ultrasons (Sonifier Cell Disruptor BRANSON B-30; amplitude : 20 microns pic à pic; durée du traitement : 3 x 5 min; fréquence : 20 s/min). L'extrait bactérien est centrifugé (7000g, 15 min, 4°C) jusqu'à l'obtention d'une solution claire.

Les activités enzymatiques sont mesurées en incubant 900 µl d'une solution de glycoprotéines à 5mg/ml dans un tampon phosphate de sodium 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4 (PBS) avec 100µl d'une suspension bactérienne à 10mg/ml ou 100µl d'extrait enzymatique pendant 1h à 37°C. La réaction est stoppée par un chauffage de 5 min à 100°C. Après centrifugation, le surnageant est passé sur un filtre Millipore (0,45 µm).

Les sucres obtenus par hydrolyse enzymatique, sont chromatographiés sur couche mince (Silicagel G60, Merck) dans un système solvant n-butanol/ acide acétique/ eau (2/1/1 v/v) et révélés après pulvérisation d'orcinol sulfurique et chauffage à 110°C.

Les activités glycosidasiques sont également dosées par l'hydrolyse de substrats synthétiques : le p-nitrophényl glycoside pour doser les activités de l'α- et β-D-galactosidase, la N-acétyl-β-D-glucosaminidase et la N-acétyl-α-D-galactosaminidase et le méthylumbelliferyl glycoside pour doser l'activité de l'α-D-neuraminidase et de l'α-L-fucosidase (Appourchaux, 1989; Boutry, 1989).

## III-ETUDE DE L'ADHÉRENCE DE *B. BIFIDUM*

### A-MISE EN ÉVIDENCE DU POUVOIR HÉMAGGLUTINANT DE *BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM*

Le pouvoir agglutinant des cellules de *Bifidobacterium bifidum* souche AA 2/2 vis-à-vis des érythrocytes a été mis en évidence selon le protocole suivant (Jones and Rutter, 1974; Katsuji *et al.*, 1989; Willemien, 1986):

### 1- Détection du seuil d'hémagglutination

Le sang est prélevé sur anticoagulant. Les érythrocytes sont sédimentés par centrifugation (10 min à 100g) et lavés trois fois par du PBS. Les bifidobactéries sont utilisées soit vivantes, soit après congélation/décongélation. Dans les deux cas, les bactéries sont préalablement lavées trois fois dans du PBS et mises en suspension dans ce même tampon à une concentration de 12 mg/ml en poids humide correspondant à  $1 \times 10^7$  cellules par ml (dénombrement à l'aide d'un Coulter Counter). La suspension de *Bifidobacterium bifidum* à 12 mg/ml est diluée par entraînement au  $\frac{1}{2}$  dans du PBS, sur plaque de microtitration (Nunc Microwells).

-50  $\mu$ l de la suspension de *B. bifidum*, aux différentes concentrations, sont déposés dans chaque puits de microtitration (Nunc Microwells).

-50  $\mu$ l d'une suspension d'érythrocytes à 2% dans du PBS (v/v) sont ajoutés dans chaque puits.

-le témoin négatif est constitué de 50  $\mu$ l d'érythrocytes à 2% (v/v) ajoutés à 50  $\mu$ l de PBS

Les lectures des plaques sont faites après 1h et 2 h d'incubation à température ambiante et sous agitation douce. L'hémagglutination est quantifiée de 0 (absence d'agglutination : sédimentation des hématies dans le fond des puits) à 4+ (agglutination maximale : formation d'un voile homogène ).

### 2-Spécificité des agglutinines vis à vis des différents groupes sanguins.

Le pouvoir agglutinant des cellules de *Bifidobacterium bifidum* souche AA 2/2 est testé vis à vis des érythrocytes humains (groupes sanguins A, B, et O) et de lapin.

### 3-Inhibition de l'hémagglutination

-25  $\mu$ l de solution d'inhibiteurs (glycoprotéines; sucres ; sérum anti-bifide) sont dilués au  $\frac{1}{2}$  par entraînement dans un tampon PBS directement dans les puits des plaques de microtitration.

-25  $\mu$ l d'une suspension cellulaire de *B. bifidum* à deux dilutions au dessous du seuil d'agglutination déterminé précédemment sont répartis dans les puits des plaques de microtitration.

-le témoin négatif est constitué de 50  $\mu$ l d'érythrocytes à 2% (v/v) ajoutés à 50  $\mu$ l de chaque solution d'inhibiteurs.

Après une heure d'incubation, 50 µl d'érythrocytes de Lapin sont ajoutés. La lecture des plaques est effectuée après 1 et 2 h d'incubation à température ambiante et sous agitation douce.

## B-DÉTECTION DE L'ADHÉRENCE DES *B. BIFIDUM* AUX MUCINES PAR LA TECHNIQUE DES "DOTS"

### 1-Préparation d'un anti-sérum anti-bifide

1 mg d'un culot de *Bifidobacterium bifidum*, lavés trois fois dans du PBS stérile, est mis en suspension dans 0,5 ml de sérum physiologique (solution de chlorure de Na 0,9% p/v) stérile. Cette suspension est émulsionnée avec 0,5 ml d'adjuvant complet de Freund. Chaque lapin est immunisé par injection intramusculaire de cette émulsion. Une injection de rappel, avec de l'adjuvant incomplet cette fois, est réalisée dans un intervalle de 1 mois. Le sang est prélevé après 10 jours sur tube sec (sans anti-coagulant). Après coagulation, le sérum est recueilli, centrifugé et décomplémenté par chauffage (30 min à 56°C). Avant conservation à -20°C, les sérums sont contrôlés par la technique de double immunodiffusion selon Ouchterlony et la technique des "dots".

### 2-Contrôle de l'immunisation des Lapins

-par la technique de double immunodiffusion selon Ouchterlony:

La double immunodiffusion est réalisée dans un gel d'agarose (Indubiose IBF Biotechnics) à 1,1% (p/v) en tampon véronal sodé 65 mM, pH 8,2.

Des dépôts de 10 µl d'extrait bactérien de *B. bifidum* et de sérum de lapin dilués sont effectués. Après 24h de diffusion en chambre humide, le gel est lavé dans du sérum physiologique pendant 30 min, recouvert de papier filtre et desséché pendant 24 h et enfin lavé à l'eau courante pendant 20 min.. Les arcs de précipitation sont colorés à l'amidoschwartz, puis le gel est décoloré dans une solution de méthanol/ acide acétique/eau (4/1/5 v/v).

-par la technique des "Dots"

Des dilutions de rang 2 sont effectuées à partir d'une suspension de *B. bifidum* (10 mg/ml). 5µl de chaque dilution sont déposés sur une feuille de nitrocellulose. Après séchage des dépôts, les sites libres de la nitrocellulose sont saturés par une solution de Sérum Albumine Bovine à 1% dans du tampon phosphate de sodium, 10mM, pH 7,2 renfermant du NaCl 150 mM et du Tween 20 à 0,1% (v/v) (PBS-Tween 20-BSA), pendant 30 min à 37°C.

Après un lavage rapide par du PBS-Tween 20, la feuille de nitrocellulose est incubée 60 min à 37°C avec le sérum de Lapin anti-bifide dilué au 1/1000 dans du Tampon PBS-Tween 20-BSA. Après 3 lavages en PBS-Tween 20, la feuille de nitrocellulose est incubée 60 min à 37°C avec un sérum de Chèvre anti-IgG de Lapin marqué à la peroxydase (Diagnostics Pasteur) dilué au 1/500 dans du PBS-Tween 20-BSA. Après 3 lavages en PBS-Tween 20, la feuille de nitrocellulose est trempée dans le révélateur (10 ml de PBS + 10 mg de diaminobenzidine + 40µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 110 volumes). La réaction est arrêtée par un lavage à l'eau.

### 3-Mise en évidence de la reconnaissance des mucines gastriques de Porc par *Bifidobacterium bifidum*

Des dilutions de rang 2 sont effectuées à partir d'une solution de mucines gastriques de Porc à 10 mg/ml dans du tampon PBS. 5µl de chaque dilution sont déposés sur une feuille de nitrocellulose et séchés. Après saturation des sites libres par une solution de BSA à 1% (p/v) dans du PBS-Tween 20, la feuille de nitrocellulose est incubée avec une suspension de *B. bifidum* à 5 mg/ml dans du PBS-Tween 20-BSA. Les bactéries fixées sont ensuite révélées par un marquage indirect à la peroxydase comme décrit précédemment.

## C-ADAPTATION DES DIFFÉRENTS PARAMÈTRES DU TEST ELISA À L'ÉTUDE DE LA FIXATION DE *B. BIFIDUM* AUX MUCINES

La technique ELISA nous permet de mesurer *in vitro* l'adhérence bactérienne à différentes molécules immobilisées sur plaques de polystyrène (Engvall and Permman, 1971; Tzouveleki *et al.*, 1991).

Principe: la première étape consiste à immobiliser sur les puits de microtitration des molécules susceptibles d'avoir une affinité pour les bactéries étudiées (protéines, glycoprotéines, cellules). Après saturation des puits par de la BSA, une suspension bactérienne est incubée en présence des molécules immobilisées. Ces puits sont ensuite lavés afin d'éliminer des bactéries non fixées. Les bactéries fixées sont ensuite reconnues par des anticorps de Lapin anti-bactéries. Ces derniers sont ensuite reconnus par un sérum anti-Lapin marqué à la peroxydase. La révélation colorimétrique est proportionnelle à la quantité de bactéries adhérentes.

## 1- Influence de la concentration en mucines et du pH du tampon de solubilisation des mucines

Nous avons choisi les mucines gastriques de Porc pour une évidente facilité d'approvisionnement. Les mucines sont solubilisées à deux concentrations différentes, 10 et 20 µg/ml, dans trois tampons de pH différents

-Tampon citrate-phosphate disodique 0,1 M, pH 5,4

-Tampon phosphate de sodium 0,1 M, pH 7,4

-Tampon carbonate de sodium- bicarbonate de soude 0,1 M, pH 9,6

L'expérience est ensuite renouvelée avec le tampon provoquant le meilleur rendement d'immobilisation mais avec des concentrations en mucines décroissantes: 100, 50, 25, 12,5, et 6,25 µg/ml.

Les puits des plaques de microtitration (Nunc-Immunoplate Maxisorp) sont recouverts par 100µl de solution de mucines et placés à 4°C pendant une nuit. Les puits sont ensuite saturés par une solution de Serum Albumine Bovine à 1% (p/v) dans du PBS, Tween 20 à 0,1 % (PBS-Tween-BSA) pendant un temps au moins supérieur à 40 min.

Après un lavage en tampon phosphate de sodium 10 mM, NaCl 150 mM pH 7,4 (PBS) renfermant du Tween 20 à 0,1% (v/v), on ajoute la suspension de bifidobactéries à 1 mg/ml en poids humide soit environ  $10^6$  bactéries/ml (dénombrement à l'aide du Coulter counter).

Après trois lavages en PBS-Tween 20, les plaques sont incubées 30 min en présence de 100µl de sérum de Lapin anti-bifide dilué au 1/1000.

Après trois lavages en PBS-Tween 20, les plaques sont incubées en présence de 100µl de sérum de Chèvre anti IgG (L + I) de Lapin marqué à la peroxydase, dilué au 1/2000 dans du PBS-Tween20-BSA (Diagnostics Pasteur).

Les puits témoins sont directement saturés par de la BSA, sans incubation préalable avec les solutions de mucines

La révélation s'effectue par l'intermédiaire d'une solution d'O-phénylène diamine à 0,2 mg/ml dans du tampon Citrate-Phosphate de sodium 0,1M, pH 5,4 contenant de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 30% (v/v) diluée au 1/100. Après 5 min, à l'obscurité, la réaction est stoppée par 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2M et l'absorbance est lue à 490 nm (Metertech Σ 960 Micro Elisa Autoreader).

Les dilutions du sérum antibifide et du sérum de Chèvre anti IgG (L + I) de Lapin marqué à la peroxydase ont été déterminées au préalable par la technique des « dots ».

## 2- Influence de la concentration en bactéries.

Les puits des plaques de microtitration sont recouverts par 100µl de mucines à 50 µg/ml. Après saturation par la BSA, des concentrations variables de bifidobactéries dans du tampon PBS-Tween 20-BSA sont ajoutées : 0,1-0,2-0,4-0,8-1,6-3,2-6,4 et 12,8 10<sup>6</sup> cellules/ml. Les bactéries fixées sont ensuite quantifiées indirectement comme précédemment.

## 3-Influence du temps d'incubation des bifidobactéries sur leur fixation spécifique.

Les bifidobactéries sont mises en contact avec les puits de microtitration recouverts par des mucines immobilisées et (ou) de la BSA pendant des temps variables (de 1 à 210 min). Après trois lavages, les bactéries fixées sont ensuite dénombrées indirectement comme précédemment. L'adhérence à la BSA représente la fixation non spécifique et la fixation aux mucines représente la somme des fixations non spécifique et spécifique.

## 4-Inhibition de l'adhérence aux glycoprotéines.

Les différents inhibiteurs (glycoprotéines; sucres) solubilisés dans du PBS sont incubées 1h à 37°C en présence d'une suspension de bactéries à une concentration finale de 10<sup>6</sup> bactéries/ml. La suspension bactérienne est ensuite déposée dans les différents puits saturés en BSA ou en glycoprotéines (Figure 9, page 55). Les puits de microtitration sont saturés, soit en mucines gastriques de Porc, soit avec les différentes glycoprotéines testées comme inhibiteurs (mucines coliques de Porc, mucines intestinales de Rat, mucines coliques de Rat, mucines de méconium, glycophorine A). L'influence de cette préincubation est ensuite mesurée par un marquage indirect à la peroxydase.

## **D-INFLUENCE DE L'ÉTAT PHYSIOLOGIQUE DE LA BACTÉRIE SUR L'ADHÉRENCE**

1-Suivi de la spécificité de l'adhérence des bactéries aux différents temps de culture et en fonction des conditions de culture par la technique ELISA

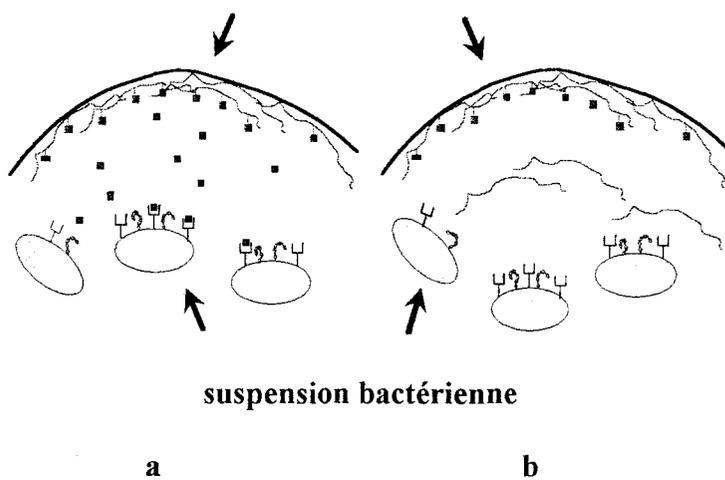
L'adhérence est testée aux différents temps de culture :

-3h30, 7h, 24h, 31h après l'ensemencement pour la culture en fermenteur

-4h, 8h, 12h, 16h et 24h après l'ensemencement pour la culture en fioles.

Les suspensions bactériennes sont ajustées à une même concentration et aux mêmes pH dans le milieu de culture avant d'être testé en ELISA. Les bactéries sont réparties soit directement

**mucines immobilisées sur plaques de polystyrène**



**Figure 9 : Caractérisation du récepteur des mucines par inhibition de l'adhérence :**

-a : inhibition par des sucres simples ou complexes

-b : inhibition par des mucines modifiées

 molécules hydrophobes,  ligands,  récepteurs

dans les puits de polystyrène, soit dans les puits de polystyrène recouverts préalablement par de la BSA, ou des mucines et de la BSA.

## 2-Spécificité d'adhérence des différentes souches de *B. bifidum*

- souches testées : *B. bifidum* AA 2/2, DSM 20082, C 306 après 7h et 24h de culture.

Les trois souches ont été cultivées en fioles à pH non régulé. L'absorbance à 550 nm et le pH du milieu de culture sont ajustés à une même valeur avant le test ELISA. Les bactéries en suspension dans leur milieu de culture sont distribuées soit dans des puits de microtitration recouverts soit par de la BSA soit par des mucines et de la BSA.

## 3-Influence du milieu de culture dans l'adhérence bactérienne

- souches testés : *B. bifidum* AA 2/2, DSM 20082, C 306 âgées de 7h.

Les trois souches ont été cultivées en fioles à pH non régulé. Le test ELISA est réalisé soit sur des bactéries dans leur milieu de culture (pH rajusté à 7), soit sur des bactéries lavées trois fois dans du PBS et remis en suspension dans du PBS. La concentration en bactéries est identique dans les deux cas.

## 4-Influence des ions $\text{Ca}^{2+}$ et $\text{Mg}^{2+}$ sur l'adhérence aux mucines

La souche *B. bifidum* DSM 20082 (31h en fermenteur) est mise en suspension dans un tampon Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM pH 7,4 contenant

- 5, 10, 20, 50 mM de  $\text{CaCl}_2$
- 5, 10, 20, 50 mM de  $\text{MgCl}_2$
- 5, 10, 20, 50 mM de  $\text{CaCl}_2$  et de  $\text{MgCl}_2$
- 5, 10, 20, 50 mM d'EDTA

Les bactéries sont ensuite mises en contact avec les puits recouverts de mucines, de BSA ou directement en contact avec les puits de polystyrène. Après trois lavages, les bactéries sont dénombrées comme précédemment.

## 5-Influence des traitements de conservation sur l'adhérence de la bactérie

L'adhérence de *B. bifidum* DSM 20082 (culture de 24h en fermenteur) est mesuré en ELISA après un stockage de 48h à 37°C, 48h à 4°C et 48h à -20°C, en condition d'aérobiose.

## 6-Influence de l'acidité sur l'adhérence de la bactérie

Des bactéries adhérentes (*B. bifidum* DSM 20082, culture de 31h en fermenteur), sont incubées pendant 1h à 39°C en PBS, pH 7,3; en tampon citrate-phosphate disodique 0,1 M, pH 5 ou en tampon citrate-phosphate disodique 0,1 M, pH 4. Les bactéries sont ensuite lavées en PBS et testées en ELISA dans ce même tampon.

## E-ADHERENCE DES BIFIDOBACTERIES AUX CELLULES EPITHELIALES HUMAINES

### 1-Cellules et conditions de culture

Nous utilisons des cellules HT-29 spontanément différenciées et des cellules HT-29-MTX sélectionnées par adaptation en présence de méthotrexate à  $10^{-6}$  M. Ces cellules nous ont été fournies par le Dr. Zweibaum.

Les cellules HT-29 et HT-29-MTX sont cultivées dans un milieu DMEM 25 mM (milieu de Eagle modifié par Dulbecco). Ce milieu est complété avec 10% de serum de veau foetal décomplémenté, 300 mg/l de L-glutamine et 50 mg/l de gentamycine. La culture des cellules s'effectue à 37°C sous air/ CO<sub>2</sub> 90%/10% (v/v). Les 2 populations de cellules sontensemencées à  $2 \cdot 10^4$  cellules/ cm<sup>2</sup>. L'entretien des cellules s'effectue par un changement journalier du milieu de culture et un repiquage hebdomadaire : les cellules forment à confluence un tapis cellulaire, elles sont détachées par une incubation de 5 min à 37°C en présence de tampon PBS renfermant de la trypsine à 0,25% (p/v) et de l' EDTA 0,53 mM. Les cellules sont ensuite lavées dans 5 ml de DMEM renfermant 10% de sérum de veau foetal décomplémenté puis centrifugées 5 min à faible vitesse (100g), remises en suspension dans du milieu DMEM, sérum de veau foetal 10%, et réensemencées à raison de  $2 \cdot 10^4$  cellules/ cm<sup>2</sup>.

Après 20 jour de culture, les cellules HT-29 forment, après confluence, une monocouche de cellules majoritairement différenciées alors que les cellules HT-29-MTX forment, après confluence, une monocouche de cellules mucosécrétrices.

### 2-Test d'adhérence

Pour les tests d'adhérence, les cellules sont cultivées dans des puits de polystyrène (CORNING) et utilisées entre le 20<sup>ème</sup> et le 40<sup>ème</sup> passage, après différenciation, au stade post-confluence.

Les cellules sont lavées 2 fois dans du PBS stérile. 200µl de milieu de culture renfermant 2 mg/ml de *B. bifidum* ou 200µl de PBS renfermant 2 mg/ml de *B. bifidum* lavés, sont incubés 15 min à 37°C sous air/CO<sub>2</sub> (90/10 v/v). Après deux lavages par du PBS stérile entre chaque étape, les boîtes sont incubées 15 min en présence de 200 µl de sérum de Lapin anti-bifide, 200 µl de sérum de Chèvre anti- IgG de Lapin marqué à la peroxydase. La révélation s'effectue par l'intermédiaire d'une solution d'O-phenylène diamine à 0,2 mg/ml dans du tampon Citrate-Phosphate disodique 0,1M, pH 5,4 contenant de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 30% (v/v) diluée au 1/100. Après 5 min, à l'obscurité, la réaction est stoppée par 100 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M et l'absorbance est lue à 490 nm.

## F-VARIATION DU TAUX D'ADHÉRENCE SELON LA NATURE DES GLYCOPROTÉINES IMMOBILISÉES.

### 1-Purification des mucines

L'intestin et le caecum de six rats femelles (Wistar) sont prélevés et placés immédiatement après la mort de l'animal dans un tampon PBS renfermant de l'azide de sodium à 0,02% (p/v) à 4°C. Le mucus intestinal est ensuite récupéré en grattant l'intérieur des organes, à l'aide d'une lame de verre. Ce mucus est ensuite homogénéisé par agitation dans 10 volumes de PBS à 4°C. Les débris cellulaires sont ensuite éliminés par trois centrifugations (15 min à 28 000g à 4°C). Les surnageants contenant des composés solubles sont ensuite dialysés 1 nuit à 4°C contre de l'eau déminéralisée et lyophilisés. Le lyophilisat est solubilisé dans un tampon Tris-HCl 10 mM, pH 7,8 et injecté sur une colonne de Sepharose 4B (2,5 x 60 cm) équilibrée dans le même tampon. L'élution des molécules par le même tampon est suivi par une détection à 280 nm et une révélation à l'orcinol. Les glycoprotéines de hauts poids moléculaires sont récupérées au volume mort, dialysées une nuit à 4°C et lyophilisées (Lamont et Ventola, 1980; Podolsky and Isselbacher, 1983; Slayter *et al.*, 1991).

Les glycoprotéines du méconium sont purifiées de la même façon que précédemment. Le méconium nous a été fourni par le laboratoire de G. Strecker.

L'analyse quantitative des oses contenus dans les glycoprotéines purifiées est réalisée par un dosage à l'orcinol sulfurique (Rimington, 1940). L'analyse qualitative est obtenue par chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse et persilylation (Kamerling *et al.*, 1975).

## 2-Traitements des mucines

### a-Déglycosylation chimique par clivage alcalin des liaisons O-glycosidiques.

A une solution de glycoprotéines (10-20 mg), ajustée à pH 10 avec de la soude diluée, on ajoute un même volume de NaOH 0,1M. Le mélange est incubé à reflux en présence de  $\text{BH}_4\text{K}$  (20-50mg) pendant 16h à 45°C, puis neutralisé (pH 6) par addition d'acide acétique à 50% (v/v). Après élimination de l'acide borique par plusieurs évaporations au méthanol, les mucines déglycosylées sont séparées par chromatographie de gel filtration sur Sepharose 4B, au volume mort de la colonne. La fraction oligosaccharidique recueillie après repérage à l'orcinol est concentrée et chromatographiée sur Bio-Gel P-4 (75 cm x 2 cm) (Montreuil *et al*, 1994).

### b-Déglycosylation enzymatique des glycoprotéines.

#### -Immobilisation des glycosidases de *B. bifidum* sur Eupergit C

50 ml d'extrait enzymatique obtenu à partir de *B. bifidum* (protocole page 49) sont mis en contact avec 2g d'Eupergit C (Rohm Pharma) équilibré en tampon phosphate de potassium 1M, pH 7,5 pendant 48 h à 4°C sous agitation douce. Après immobilisation des protéines de l'extrait bactérien, le gel est ensuite désactivé par un traitement à l'éthanolamine 1M dans le tampon phosphate de potassium 0,1M, pH 7,5, pendant 48 h à 4°C.

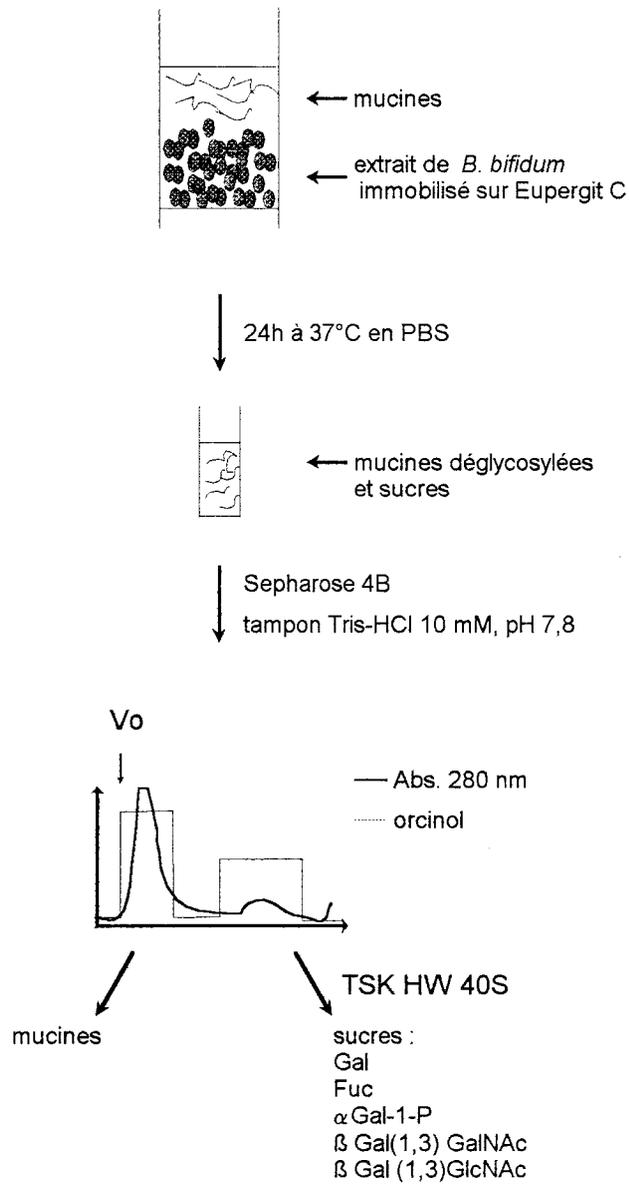
Le gel est ensuite lavé plusieurs fois par le même tampon et conservé à 4°C.

#### -Hydrolyse des mucines (figure 10, page 60)

5 mg de glycoprotéines, solubilisées dans 2 ml de PBS, sont incubées avec les enzymes de *B. bifidum* immobilisées. L'hydrolyse s'effectue, en "batch", à 37°C pendant 24h. Après sédimentation des billes d'Eupergit, un premier surnageant est récupéré ainsi que ceux obtenus après 2 lavages consécutifs dans le même tampon, les surnageants sont rassemblés, concentrés et chromatographiés sur une colonne de Sepharose 4B (2 x 25 cm). L'élution en eau est suivie par un repérage à l'orcinol. Les mucines déglycosylées sont recueillies au volume mort et les fractions contenant des sucres sont concentrées et injectées sur une colonne de gel filtration (1,6 x 100 cm) TSK HW 40S équilibrée en eau. Les différents sucres sont élués par de l'eau, lyophilisés et seront utilisés comme inhibiteurs dans l'étude de l'adhérence.

### c-Oxydation périodique des mucines

1 mg de glycoprotéines est traité par 5 ml de tampon phosphate-citrate de sodium, pH 4,5, contenant 0,05M de  $\text{NaIO}_4$ , pendant une nuit à 4°C. L'excès de périodate est réduit par



**Figure 10: Schéma d'isolement des différentes fractions glycosidiques après hydrolyse des mucines par l'extrait enzymatique de *B. bifidum*.**

200µl d'éthylène glycol, celui-ci est ensuite éliminé par dialyse (48h contre de l'eau). Un témoin est réalisé en présence d'iodate de sodium 0,01M (Pazur; 1994).

#### d-Hydrolyse protéasique des mucines

10 mg de mucines de méconium sont solubilisées dans un tampon Tris-HCl 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 10mM, pH 7,8 en présence de 200µg de pronase E (MERCK). Après 24h d'incubation à 39°C, les mucines sont séparées de l'enzyme par gel filtration sur Sepharose 4B.

### G-MISE EN EVIDENCE DE STRUCTURES BACTERIENNES RESPONSABLES DE L'ADHERENCE AUX MUCINES

#### 1-Traitement de la bactérie par la chaleur et les protéases

Les bactéries décongelées sont relavées trois fois dans du PBS, avant les différents traitements.

- par choc thermique: les bactéries sont mises en suspension dans du PBS et plongées dans un bain bouillant pendant 1, 2, 5, 10, 20, 40 et 60 min à 100°C avant d'être refroidies et testées en ELISA et en hémagglutination.

- par les protéases : les bactéries sont mises en suspension dans un tampon Tris-HCl 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 7,8 contenant de la pronase (enzyme/substrat = 0,5% poids sec/poids humide). Après 10, 20, 45, 60 et 120 min; d'incubation à 40°C, les bactéries sont centrifugées et testées en ELISA et en hémagglutination.

#### 2-Adhésion des milieux de culture après différents temps de culture

Les milieux de culture, recueillis aux différents temps de culture après centrifugation, sont filtrés sur filtre millipore 0,22 µm afin d'éliminer toutes les bactéries.

-100µl de milieu sont déposés dans chaque puits de microtitration recouvert par de la BSA et des mucines gastriques de Porc ou non. Les substances adhérentes aux puits sont ensuite révélées par marquage indirect.

#### 3-Mise en évidence de structures bactériennes dans le tampon d'incubation

Des bactéries *B. bifidum* DSM 20082 conservées par congélation, sont incubées après décongélation et lavages, en tampon bis-Tris 50 mM, pH 6,8 pendant 0, 16 h et 3 J. La même expérience est réalisée sur des culots récupérés après éclatement des bactéries aux ultrasons.

Les différents surnageants d'incubation sont stérilisés sur filtres de 0,22  $\mu\text{m}$ , dialysés, concentrés et analysés par SDS-PAGE, électrotransfert et révélation par des mucines biotinylées.

#### 4-Isolement de structures bactériennes

##### a-Solubilisation par les détergents

Plusieurs détergents ont été utilisés : Zwittergent 3-8, Zwittergent 3-14, Zwittergent 3-16 (Zwitterionique), Triton X100, Octyl- $\beta$ -D-glucopyranoside, Desoxy Big CHAP, Dodecyl- $\beta$ -D glucopyranoside, Digitonine, Heptyl- $\beta$ -D-thiogluco-pyranoside (non ioniques).

3g de bactéries décongelées et lavées (poids humide) sont mis en suspension dans un tampon phosphate-citrate 50 mM,  $\text{MgCl}_2$  150 mM, PMSF 1 mM, saccharose 100 mM, pH 5,4 contenant 0,1% de détergent. Les bactéries sont incubées 25 min à 45°C sous agitation constante, le mélange est ensuite dilué au 1/10<sup>ème</sup>, puis centrifugé 30 min à 4 °C à 10 000g (Domenico *et al.*, 1989).

Ce protocole est adapté à la solubilisation par l'octyl- $\beta$ -D-glucopyranoside. Les bactéries lavées sont solubilisés dans un tampon Hepes-Tris 20 mM, KCl 150 mM, saccharose 100mM, dithiothreitol 0,1mM et EDTA 0,2 mM pH 7,4 contenant 1% d'octyl- $\beta$ -D glucopyranoside (Schäli and Fanestil, 1985; Soumarmon *et al.*, 1983).

La même incubation est également réalisée pendant 15 min sur une culture fraîche de *B. bifidum* DSM 20082 âgée de 7 et 31h.

##### b-Solubilisation par les protéases

Les bactéries décongelées et lavées sont mises en suspension dans un tampon Tris-HCl 10 mM,  $\text{CaCl}_2$  10 mM pH 7,8 contenant des protéases : la Pronase E, mélange d'exo- et endopeptidases de *streptomyces griseus* (Merck) ou la Pancréatine, mélange des protéases, lipases, ribonucléases et d' $\alpha$ -amylase provenant des sécrétions pancréatiques de Porc (Sigma) dans un rapport enzyme/bactérie de 1%, 0,2%, 0,1% et 0,05% (poids sec/poids humide). Les bactéries sont incubées 1h à 40°C sous agitation douce puis centrifugées 30 min à 4 °C à 10000g.

Pour les différents types de solubilisation utilisés, les surnageants après centrifugation sont récupérés, filtrés sur membrane filtrante de 0,22  $\mu\text{m}$ , dialysés contre de l'eau contenant de l'azide à 0,02% pendant 48h à 4°C et lyophilisés.

## 5-Electrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes

Les différents surnageants lyophilisés sont repris par de l'eau distillée et mélangés avec un tampon échantillon d'électrophorèse (Tris-HCl 10 mM pH 8,8, SDS 2%,  $\beta$ -mercaptoéthanol 4,5% en présence de bleu de bromophénol) (v/v) puis chauffés pendant 3 minutes à 100°C.

Le gel de concentration possède une réticulation de 5% en acrylamide dans un tampon Tris-HCl pH 8,8. Le gel de séparation est réalisé en gradient 5-15% en acrylamide. Le tampon de migration ainsi que les gels de concentration et de séparation renferment 0,1 % de SDS. Les protéines sont réparties par dépôts de 5 à 20  $\mu$ l (0,1 mg de protéine/ dépôt) (Laemmli, 1970). L'électrophorèse est réalisée sous courant constant de 50 mA jusqu'à ce que le marqueur (bleu de bromophénol) ait migré jusqu' au bas du gel.

Après migration, les protéines sont révélées par coloration au bleu de Coomassie ou transférées sur feuille de nitrocellulose. Les témoins de calibration de masse moléculaire (14 kDa-94 kDa) nous sont fournies par Pharmacia Biotech.

## 6-Electrotransfert sur membrane de nitrocellulose

Après électrophorèse en gel de polyacrylamide, les protéines ayant migré selon leur masse moléculaire sont transférées électrophorétiquement (cellule de transfert Biorad) sur nitrocellulose 0,45  $\mu$ m (Schleicher et Schull) selon la technique de Towbin *et al.* (1979). Le tampon utilisé est constitué de Tris 25 mM, glycolle 200 mM pH 8,4 et contient 20% de méthanol. L'électrotransfert est réalisé sous 75 mA pendant une nuit à 4°C. Les protéines fixées à la membrane de nitrocellulose sont ensuite détectées par immuno-révélation, après une révélation préalable des protéines transférées et des témoins de masse moléculaire au Rouge Ponceau.

## 7-Détection des protéines après transfert sur nitrocellulose.

La membrane de nitrocellulose, sur laquelle sont transférées les protéines, est tout d'abord saturée de façon à bloquer tous les sites actifs restés libres et capables de réagir avec les protéines. La saturation est réalisée en immergeant la feuille de nitrocellulose dans une solution de PBS contenant 1% de BSA (p/v). Après deux heures d'incubation sous agitation douce à température ambiante, la membrane de nitrocellulose est lavée avec une solution de PBS et placée pendant 1h avec les mucines biotinylées solubilisées dans du PBS. La membrane de nitrocellulose est ensuite lavée quatre fois pendant 15 min avec une solution de PBS, quatre

fois pendant 15 min avec une solution de PBS, Tween 20 à 0,05%. Finalement, la membrane de nitrocellulose est incubée pendant 1h à température ambiante en présence d'avidine-peroxydase à 1 % (v/v) dans du PBS. Après quatre lavages en PBS, la membrane est révélée par addition de 10ml de tampon PBS renfermant 10 mg de diamino-benzidine et 40 µl d'eau oxygénée à 110 volumes. La diamino-benzidine est un chromogène oxydable par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en présence de peroxydase. La réaction colorée est arrêtée par un lavage à l'eau.

#### 8-Marquage des mucines gastriques de Porc à la Biotine

- Les mucines gastriques de Porc sont solubilisées à une concentration de 1 mg/ml dans un tampon bicarbonate de sodium 0,1 M, pH 8,5 puis incubées 30 min à température ambiante avec de la N-hydroxysuccinimide biotine (Pierce) dans un rapport mucines/biotine de 2/1 (p/p). L'incubat est ensuite déposé sur une colonne de Sepharose 4B équilibrée en PBS. Les mucines biotinylées sont exclues au volume mort de la colonne.

#### 9-Détection des propriétés adhérentes par la technique ELISA

Les propriétés adhérentes de la bactérie avant et après traitement par la chaleur, par les détergents et les protéases sont analysées par la technique ELISA décrite précédemment. Dans chaque cas, les bactéries sont lavées trois fois en PBS avant d'être déposées dans les puits de microtitration saturés par des mucines, de la BSA ou directement sur les puits de polystyrène.

Les extraits présents dans le surnageant d'extraction obtenus après action des protéases et des détergents sont analysés de la même façon. Les surnageant lyophilisés sont solubilisés dans du PBS à une concentration de 2 mg/ml. 100 µl de chaque solution d'extrait sont ensuite déposés dans les puits de microtitration saturés par des mucines, de la BSA ou directement sur les puits de polystyrène. L'adhérence d'une suspension bactérienne non traitée représente un témoin comparatif.

Afin de mettre en évidence l'intervention des structures isolées par les détergents ou les protéases dans le mécanisme d'adhérence de *B. bifidum* aux mucines, nous avons étudié l'inhibition de l'adhérence de ces extraits aux mucines immobilisées par une solution de mucines. Les extraits sont incubés 1 h à 37°C en présence de mucines gastriques de Porc à 5 mg/ml avant d'être mis en présence de mucines immobilisées.

L'influence de la présence de traces de détergent résiduelles sur la spécificité d'adhérence est également étudiée. La fixation des bactéries non traitées est mesurée en présence de 10 mg/ml de détergent.

# **Résultats et Discussions**

## **MISE EN EVIDENCE D'UNE INTERACTION SPECIFIQUE ENTRE BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM ET LA MUQUEUSE INTESTINALE**

### **I-MATÉRIEL BIOLOGIQUE ÉTUDIÉ : BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM**

La croissance des bactéries est suivie par l'absorbance à 550 nm. Après une phase de latence qui peut atteindre 4 h, la phase stationnaire est obtenue à partir de 24 h de culture, au delà de ce temps, la valeur de la biomasse est constante, on constate même une diminution très légère de l'absorbance, signe d'un début d'autolyse. Le temps de doublement de *B. bifidum*, dans les conditions d'une culture en fiole, à pH non régulé, est d'environ 10 h (figure 11, page 67). En fin de culture, on récupère une biomasse de l'ordre de  $10^9$  bactéries/100 ml, soit environ 0,5 g de bactéries /100 ml (poids humide).

Le pH du milieu de culture (pH = 6,1) chute à 5,4 dès les deux premières heures de culture, passe en dessous de la valeur 5 après 16h de culture pour atteindre pH 4 en fin de culture, c'est à dire après 48 h de culture. L'acidification du milieu s'explique par la fermentation des sucres présents dans le milieu de culture et leur transformation en acétate, lactate et formiate par la bactérie. Comme les expériences nécessitent beaucoup de matériel bactérien, nous avons eu recours à la culture en masse en fermenteur. Dans les conditions de culture en fermenteur de 6 l, le pH est régulé automatiquement à une valeur de 6,1 et la biomasse obtenue en fin de culture est de l'ordre de 20 g (poids humide).

### **II-MISE EN ÉVIDENCE DU POUVOIR HÉMAGGLUTINANT DES BIFIDOBACTÉRIES**

Les deux souches de bifidobactéries : *Bifidobacterium bifidum* AA 2/2 et *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082 ayant subi un traitement de congélation/décongélation provoquent l'agglutination des érythrocytes de Lapin avec le même seuil d'hémagglutination correspondant à une concentration d'environ  $7.10^5$  bactéries/ml. *B. bifidum* DSM 20082 fraîchement cultivée entraîne également l'agglutination des érythrocytes de Lapin mais avec un seuil beaucoup plus élevé correspondant à deux dilutions de rang 2, c'est à dire à  $28.10^5$  bactéries/ml. Ces réactions sont effectuées sur des bactéries lavées et on peut donc imaginer dans ce cas que ce sont des structures intrinsèques à la surface de la bactérie qui réagissent avec les érythrocytes. De plus le traitement de congélation/décongélation modifierait la

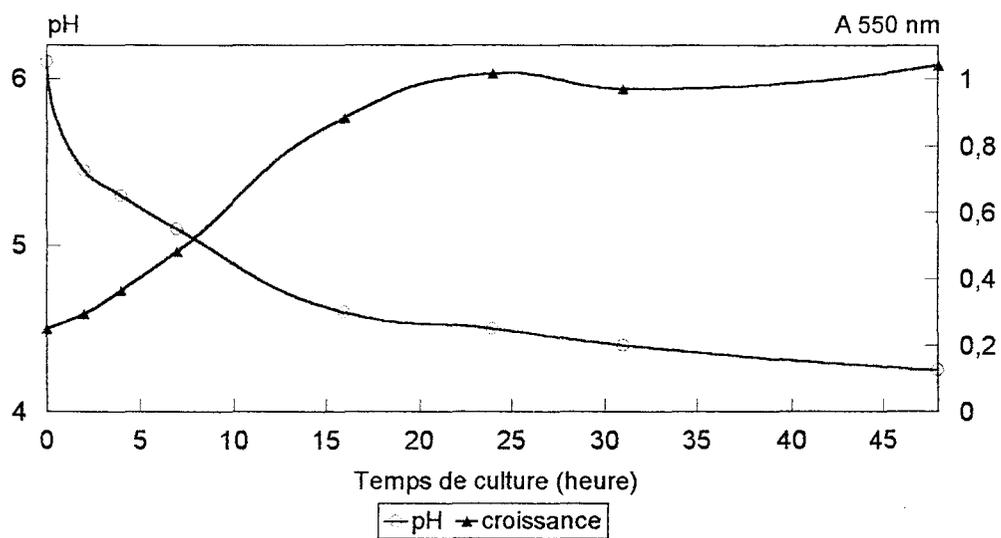


Figure 11 : Courbe de croissance et variation du pH au cours d'une culture de *B. bifidum* sur milieu TPY.

structure de la paroi, dévoilant ou rendant plus accessible les structures responsables de l'hémagglutination.

## **Discussion**

La technique d'agglutination est une méthode simple pour étudier les interactions cellule-cellule. L'agglutination est un phénomène complexe conduisant à la réunion en amas de cellules telles que des globules rouges et des bactéries. Elle peut être schématiquement décomposée en deux étapes principales, la première correspond à la fixation spécifique des anticorps sur les structures antigéniques, la seconde à la formation d'agglutinats si les conditions expérimentales le permettent. Comme une suspension d'hématie en tampon PBS constitue un système stable, l'introduction d'anticorps spécifiques provoque la disparition de cette stabilité et conduit à la formation d'agrégats de globules rouges. La réaction d'agglutination peut s'expliquer par la formation d'un réseau tridimensionnel entre des molécules d'anticorps multifonctionnelles et des structures antigéniques multivalentes.

Nous avons mis en évidence l'existence d'agglutinines chez *B. bifidum*. Ces agglutinines fixeraient spécifiquement des structures antigéniques portées par les hématies de Lapin. Afin de mieux connaître la spécificité de ce phénomène d'agglutination, nous avons utilisé des hématies possédant différents déterminants antigéniques, en l'occurrence des hématies humaines des groupes sanguins A, B et O.

D'après les résultats obtenus, *B. bifidum* reconnaît aussi bien les structures de surface des hématies de Lapin que des hématies humaines des différents groupes sanguins. L'interaction bifidobactéries/hématie est donc indépendante de la structure des antigènes de surface.

## **III- MISE EN ÉVIDENCE D'UNE INTERACTION MUCINE-B. BIFIDUM**

### **A-PAR LA MÉTHODE DES "DOTS"**

Nous avons d'abord vérifié la bonne immunisation des lapins contre *B. bifidum* par la technique de double immunodiffusion selon Ouchterlony. Les anticorps anti-bifide présents dans les sérums récoltés 23 jours et 51 jours après l'injection, donnent plusieurs arcs de précipitation avec les antigènes solubles présents dans l'extrait de *B. bifidum*, préparé selon le protocole décrit page 51, utilisé pur, dilué au 1/2 et au 1/10.

Ces sérums ont également été testés par la technique des "Dots". L'extrait de *B. bifidum* immobilisé sur nitrocellulose est reconnu par les anticorps présents dans le sérum de Lapin. Ceux-ci sont ensuite détectés par une solution de sérum de Chèvre anti-lapin marqué à la peroxydase. Les sérums des Lapins immunisés par des cellules de *B. bifidum* entières contiennent bien des anticorps anti-bifides. Nous avons utilisé ce sérum pour visualiser l'interaction mucine-bactéries. Les mucines gastriques de Porc fixées sur feuille de nitrocellulose sont reconnues par *B. bifidum*. La visualisation est ensuite réalisée par un marquage indirect à la peroxydase. Cette première méthode, plus qualitative que quantitative, nous permet de conclure à une interaction entre les mucines gastriques de Porc et *B. bifidum*.

## B-PAR LA TECHNIQUE ELISA

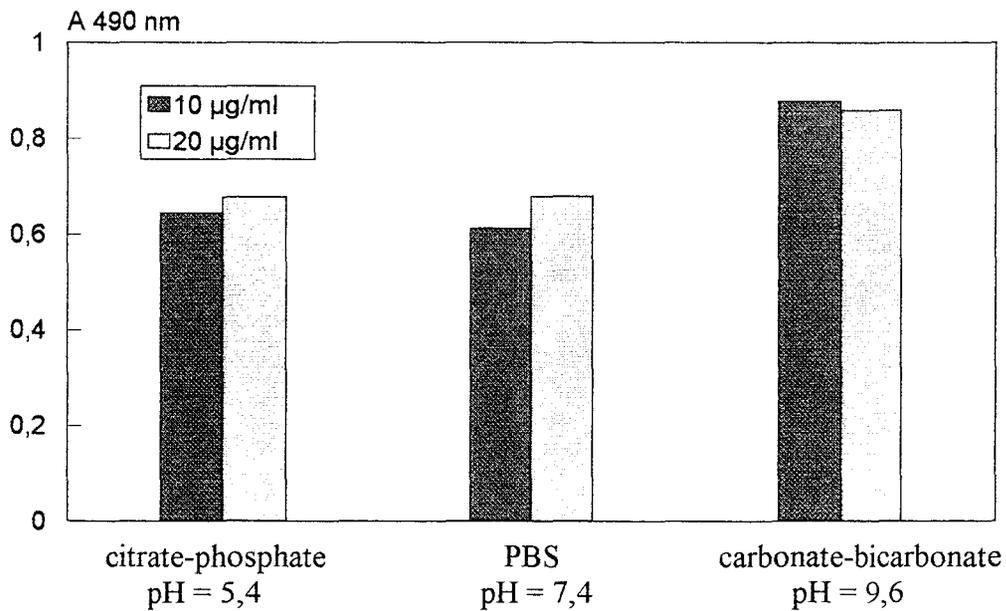
La technique ELISA est couramment employée pour les études d'adhérence bactérienne. Celle-ci doit être adaptée et optimisée selon la nature de l'interaction étudiée.

### 1-Influence de la concentration en mucines et du pH du tampon d'immobilisation des mucines

Cette étude permet de définir le meilleur pH à utiliser pour obtenir la saturation des puits de la plaque de microtitration. Comme nous le montre la figure 12 page 70, c'est à pH basique qu'on obtient les meilleurs résultats. Pour la suite de nos expérimentations, nous choisirons le tampon carbonate de sodium/bicarbonate de soude à pH 9,6 pour la fixation des mucines aux puits de polystyrène. Des concentrations en mucines comprises entre 10 et 50 $\mu$ g/ml de tampon carbonate/bicarbonate sont suffisantes pour réaliser le test ELISA.

### 2-Influence de la concentration bactérienne et du temps d'incubation sur la spécificité d'adhésion

L'absorbance à 490 nm mesure la quantité de bactéries fixées au différents supports. L'interaction des bifidobactéries avec les mucines immobilisées est proportionnelle dans un intervalle de concentration en bactérie compris entre 0,2 et 2mg/ml. Un phénomène de saturation apparaît pour les concentrations supérieures. L'interaction avec la BSA, qu'on peut représenter comme le résultat de l'adhérence non spécifique, est très faible jusqu'à une concentration bactérienne de 1mg/ml, puis augmente en fonction de la concentration bactérienne jusqu'à atteindre des valeurs identiques à celles obtenues sur les mucines immobilisées.



**Figure 12 : Influence du pH sur l'immobilisation des mucines.**

Les mucines gastriques de porc sont solubilisées dans trois tampons de pH différent (tampon citrate-phosphate disodique 0,1 M, pH 5,4; tampon phosphate de sodium 0,1 M, pH 7,4 et un tampon carbonate de sodium-bicarbonate de soude 0,1M, pH 9,6) aux concentrations de 10µg/ml et 20µg/ml. Ces mucines sont incubées dans les puits de polystyrène une nuit à 4°C. L'adhérence bactérienne vis à vis des mucines se mesure par un marquage indirecte à la peroxydase. Les résultats sont la moyenne de 5 expérimentations ou plus.

Pour étudier la spécificité de fixation, il faut donc se placer à une concentration bactérienne proche de 1 mg/ml. En limitant les interactions entre bactéries, on peut ainsi étudier la spécificité des interactions entre les bifidobactéries et les mucines (figure 13, page 72).

L'étude cinétique de l'adhérence de *B. bifidum* aux mucines gastriques immobilisées révèle une fixation très rapide des bactéries (dès les premières minutes), le plateau est atteint au bout de 30 min. Pour des temps supérieurs, la fixation aux mucines reste identique par contre la fixation non spécifique, analogue à celle représentée par l'adhérence à la BSA, augmente avec le temps d'incubation (figure 14, page 72).

Pour visualiser l'adhérence spécifique des bifidobactéries aux mucines immobilisées, il faut utiliser une suspension bactérienne calibrée à 1mg/ml et maintenir un temps de contact avec les glycoprotéines qui ne dépasse pas 30 min.

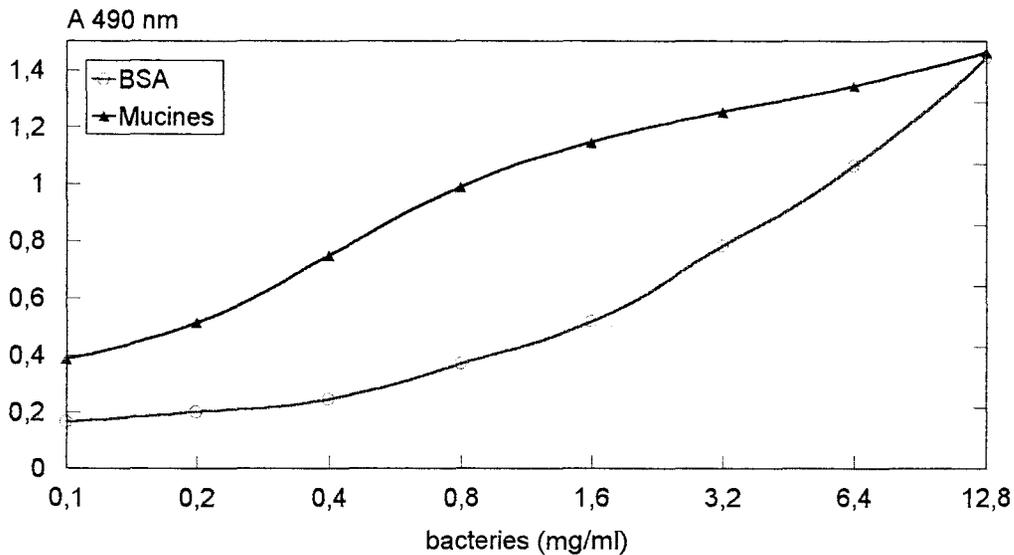
#### **IV- ETUDE DE LA SPECIFICITE DE LA REACTION D'ADHERENCE BACTERIENNE AUX MUCINES**

Après avoir déterminé les différents paramètres permettant d'adapter la technique ELISA à l'étude de l'adhérence spécifique des bifidobactéries aux mucines, nous avons étudié les différents caractères propres à la bactérie intervenant dans ce phénomène.

#### **A-VARIATIONS D'ADHÉRENCE DES BIFIDOBACTÉRIES AU COURS DE LEUR CROISSANCE**

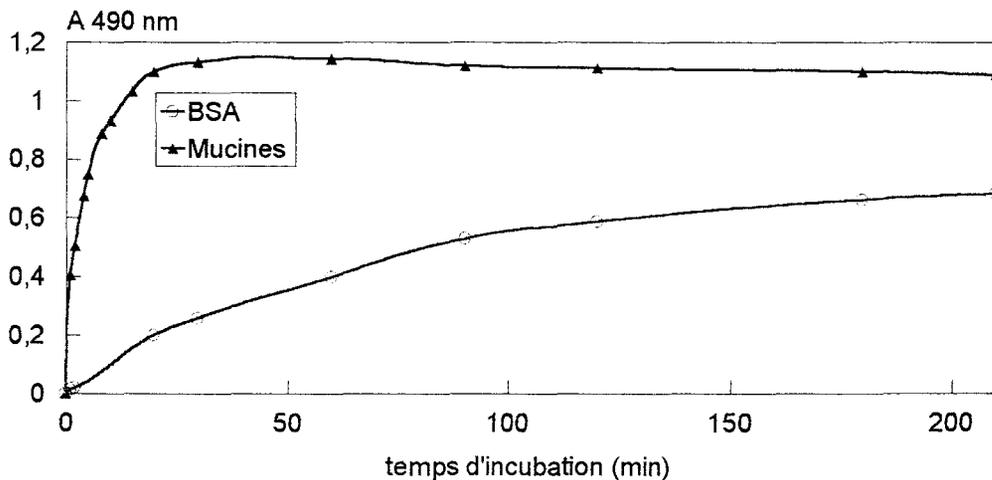
La spécificité de fixation aux mucines varie avec l'âge de la culture. La fixation spécifique est calculée grâce à la relation suivante :  $A_{490nm}(\text{mucines}) - A_{490nm}(\text{BSA})$  et la fixation non spécifique est mesurée par le taux de fixation à la BSA ou de fixation directe des bactéries au polystyrène.

Lorsque l'on suit la fixation spécifique des bactéries cultivées en fioles, on observe une augmentation rapide des propriétés adhérentes des bactéries avec un maximum après 5h de culture. Ce temps correspond au début de la phase exponentielle de croissance. L'adhérence spécifique diminue ensuite avec l'âge de la culture. Par contre, lorsqu'on suit l'adhérence au polystyrène, celle-ci augmente pour des temps supérieurs à 5h de culture. Après 10h de culture, les bactéries perdent totalement leur spécificité de fixation (figure 15, page 74).



**Figure 13 : Influence de la concentration en bactéries sur la spécificité de fixation.**

La suspension bactérienne, ajustée à différentes concentrations dans du PBS, est incubée 30 min à 37°C soit dans les puits saturés en mucines, soit dans les puits saturés en BSA. L'adhérence est ensuite mesurée par un marquage indirect à la peroxydase. Les résultats sont la moyenne de 5 expériences effectuées ou plus.



**Figure 14 : Influence du temps d'incubation sur la spécificité de fixation des bifidobactéries.**

La suspension bactérienne est ajustée à 1 mg/ml dans du PBS. Le temps de contact des bactéries avec les puits saturés en mucines ou dans les puits saturés en BSA est variable. L'adhérence est ensuite mesurée par un marquage indirect à la peroxydase. Les résultats sont la moyenne de 5 expériences effectuées ou plus.

Cette même expérience est réalisée sur des bactéries cultivées en fermenteur. On observe une augmentation de la fixation spécifique en fonction du temps de culture avec une stabilisation en phase stationnaire de croissance puis une diminution après 24 h de culture. L'adhésion non spécifique augmente également légèrement après 3h30 de culture, mais reste bien inférieure à la fixation non spécifique puis diminue après 24h (figure 16, page 74). Cette augmentation des propriétés adhérentes de la bactérie n'est due ni à une augmentation de la biomasse, ni au pH, les suspensions bactériennes étant ajustées à une même concentration et à un même pH avant le test ELISA.

Le seul paramètre variant entre les deux types de culture est le pH du milieu. Celui-ci chute de 6,1 à 5,5 après 5h de culture alors qu'il est maintenu à une valeur de 6,1 lors de la culture en fermenteur (figure 11, page 67).

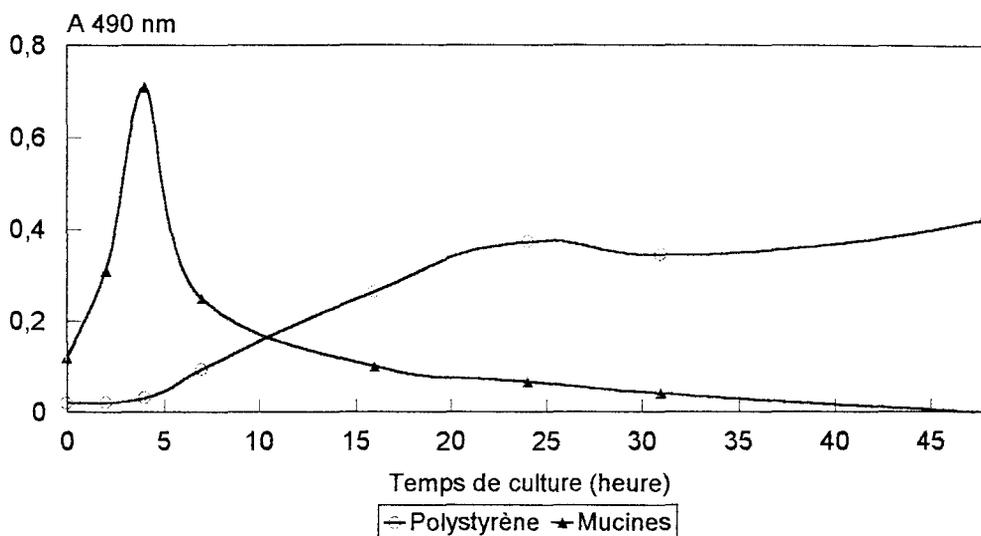
Pour essayer d'expliquer une quelconque influence du pH sur les propriétés adhérentes, nous avons réalisé un test ELISA sur des bactéries incubées 1 h à 39°C (température de culture des bifidobactéries) dans des tampons de pH différent. On observe aucune perte d'adhérence significative pour un tampon de pH 5, par contre les bactéries perdent 40% d'adhérence pour un tampon de pH 4 (résultats non représentés). Le pH acide du milieu de culture pourrait être responsable de la perte d'adhérence spécifique observée dans le cas d'une culture en fioles, à pH non régulée.

## B-VARIATIONS D'ADHÉRENCE SELON LA SOUCHE DE *B. BIFIDUM*

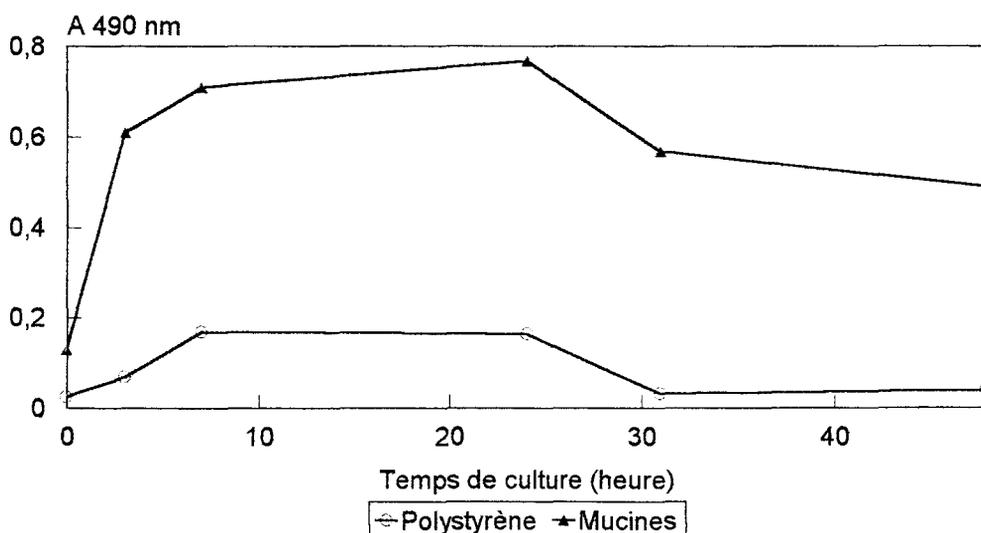
Trois souches de bactérie en phase exponentielle de croissance sont étudiées, *B. bifidum* DSM 20082, *B. bifidum* AA 2/2 et *B. bifidum* C306. L'adhérence spécifique vis-à-vis des mucines est prise en compte quand, par le calcul  $A_{490nm}(\text{mucines}) - A_{490nm}(\text{BSA}) > 0$ . L'interaction la plus importante est observée pour la souche DSM 20082 (figure 17, page 76). Le comportement est pratiquement identique pour la souche sauvage, on note une réactivité moindre pour *B. bifidum* AA 2/2.

## C-VARIATIONS D'ADHÉRENCE EN FONCTION DE DIFFÉRENTS PARAMÈTRES

1-milieu de culture



**Figure 15 : Spécificité de fixation au cours de la croissance bactérienne (pH non régulé).** Les bifidobactéries sont cultivées en milieu TPY, dans des conditions de pH non régulé. Le pH et la concentration bactérienne sont réajustés avant le test ELISA. La fixation bactérienne est mesurée par un marquage indirect à la peroxydase. Les résultats sont la moyenne de 5 expérimentations ou plus.



**Figure 16 : Spécificité de fixation au cours de la croissance bactérienne (pH régulé).** Les bifidobactéries sont cultivées en milieu TPY, dans des conditions de pH régulé (fermenteur). La fixation bactérienne est mesurée comme précédemment. Les résultats sont la moyenne de 5 expérimentations ou plus.

La caractérisation d'un intermédiaire dans l'adhérence des lactobacilles aux cellules CaCo2, nous a amené à étudier l'influence du milieu de culture sur le mécanisme d'adhésion (Bernet *et al.*, 1993).

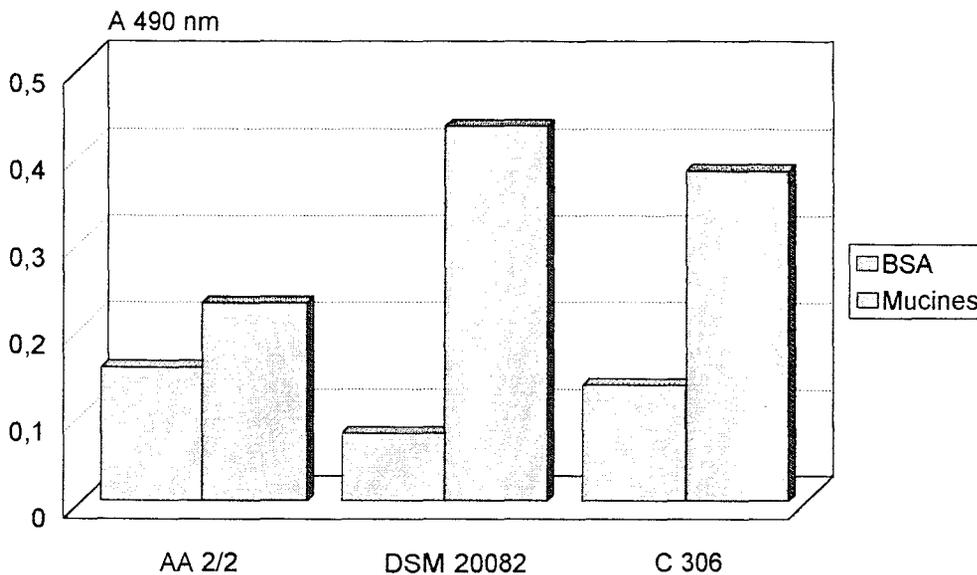
L'adhérence des souches *B. bifidum* DSM 20082, *B. bifidum* AA 2/2 et *B. bifidum* C306 aux mucines est testée par la technique ELISA. Les cellules bactériennes sont lavées par du PBS, puis remises en suspension soit dans du PBS, soit dans du milieu de culture préalablement ajusté à pH 7. Le comportement des trois souches est indentique dans ce test, nous avons rassemblé les résultats obtenus avec la souche *B. bifidum* DSM 20082 dans la figure 18, page 76. On remarque qu'il n'y a pas de modifications significatives de l'adhérence en absence ou en présence de milieu de culture. Cependant, comme l'adhésion bactérienne est le résultat d'interactions complexes, nous avons testé directement le milieu de culture par la technique ELISA. Les résultats sont rassemblés dans le tableau IV, page 77.

Lorsqu'on examine l'adhérence du milieu de culture pour des bactéries cultivées en fioles (pH non régulé) en fonction du temps de culture, on ne remarque pas de variation de l'absorbance à 490 nm, ce qui suggère, dans ce cas, que le milieu de culture ne renferme pas de structures reconnaissant les mucines ou que ces structures libérées ne sont pas reconnues par les anticorps anti-bifide. On peut supposer dans ce cas, qu'il pourrait s'agir d'un métabolite secondaire dont l'origine serait intracellulaire.

Dans le cas de culture en fermenteur (pH régulé), on observe une augmentation de l'interaction du milieu de culture au polystyrène en fonction de l'âge de la culture. Plus la bactérie est âgée, plus on mesure une adhérence au niveau des puits non saturés. On remarque toutefois que l'interaction avec les mucines est à un niveau très faible (10 à 30 fois plus faible) et qu'il n'y a pas de modifications en fonction de l'âge de la culture. Ces résultats montrent que les mucines ne sont pas reconnues (même réactivité qu'en pH non régulé) mais que des molécules hydrophobes sont libérées dans le milieu de culture (variation par rapport au milieu non ensemencé :  $t = 0$ ). Ces molécules proviennent des enveloppes bactériennes puisqu'il y a une reconnaissance par les anticorps anti-bifide.

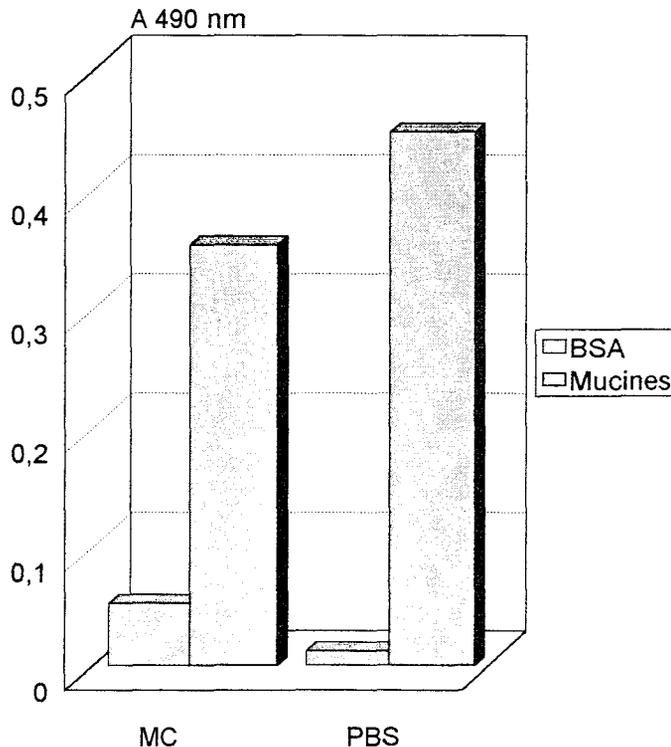
Afin de déterminer la nature des substances libérées dans le moût de fermentation, en fonction de l'âge de la culture, ceux-ci ont été soumis à l'analyse électrophorétique en SDS-PAGE.

Dans le cas de culture en fioles (pH non régulé), aucune structure protéique d'origine bactérienne n'est caractérisée après révélation au Bleu de Coomassie ou au nitrate d'argent,



**Figure 17 : Spécificité de fixation des différentes souches de *B. bifidum* étudiées.**

Les différentes souches de *B. bifidum*, ajustées à une concentration de 0,5 mg/ml, sont testées dans leur milieu de culture. Après 30 min d'incubation en présence soit de BSA, soit de mucines immobilisées, l'adhérence bactérienne est mesurée par un marquage indirect à la peroxydase. Les résultats sont la moyenne de 6 expérimentations ou plus.



**Figure 18 : Influence du milieu de culture sur l'adhérence de *B. bifidum*.**

Le test ELISA est réalisé avec une suspension de *B. bifidum* DSM 20082 ajustée à 0,5 mg/ml soit dans du PBS (PBS), soit dans leur milieu de culture (MC). Après 30 min d'incubation en présence soit de BSA, soit de mucines immobilisées, l'adhérence bactérienne est mesurée par un marquage indirect à la peroxydase. Les résultats sont la moyenne de 6 expériences.

**Tableau IV : Adhérence des structures présentes dans le milieu de culture, au polystyrène et aux mucines immobilisées (A 490 nm).**

-Culture en fioles (pH non régulé)

Adhérence des milieux de culture en fonction du temps de culture (A 490 nm)						
support	0h	4h	8h	12h	16h	24h
Polystyrène	0	0,027	0,071	0,066	0,055	0,070
mucines	0	0,028	0,035	0,035	0,025	0,026

-culture en fermenteur (pH régulé)

Adhérence des milieux de culture en fonction du temps de culture (A 490 nm)					
support	0h	3h	7h	24h	31h
Polystyrène	0	0,113	0,303	0,686	0,672
mucines	0	0,017	0,043	0,030	0,028

Les milieux de culture, prélevés au cours de la culture bactérienne, sont stérilisés par filtration sur pores de 0,22 µm puis sont incubés soit directement dans les puits de polystyrène, soit dans les puits préalablement recouverts de mucines. L'adhérence des milieux de culture se mesure par l'intermédiaire des anticorps anti-bifide. Les résultats sont la moyenne de huit expériences.

même après concentration des milieux de culture. Ces résultats confirment bien ceux obtenus par la technique ELISA.

Par contre, dans le cas des cultures en fermenteur, il est possible de caractériser l'apparition de structures protéiques dont l'intensité augmente en fonction du temps de culture. On observe, après électrophorèse en SDS-PAGE et révélation au bleu de coomassie, des bandes de hauts poids moléculaires (> 43 kDa). Après électrophorèse, immunotransfert et utilisation de mucines biotinylées, deux bandes se révèlent affines pour les mucines, dont une de très haut poids moléculaire (> 94 kDa). La proportion relative de ces deux bandes est très faible par rapport aux protéines totales du milieu de culture. Les résultats sont rassemblés dans la figure 19, page 79.

## 2-Influence des cations

L'adhérence est indépendante du calcium et du magnésium. L'ajout de ces ions ne modifie pas l'adhérence de la souche de référence vis-à-vis des mucines ou du polystyrène. Ces observations sont corroborées par le fait que l'EDTA ajouté au milieu d'incubation n'entraîne pas de modification de l'adhérence.

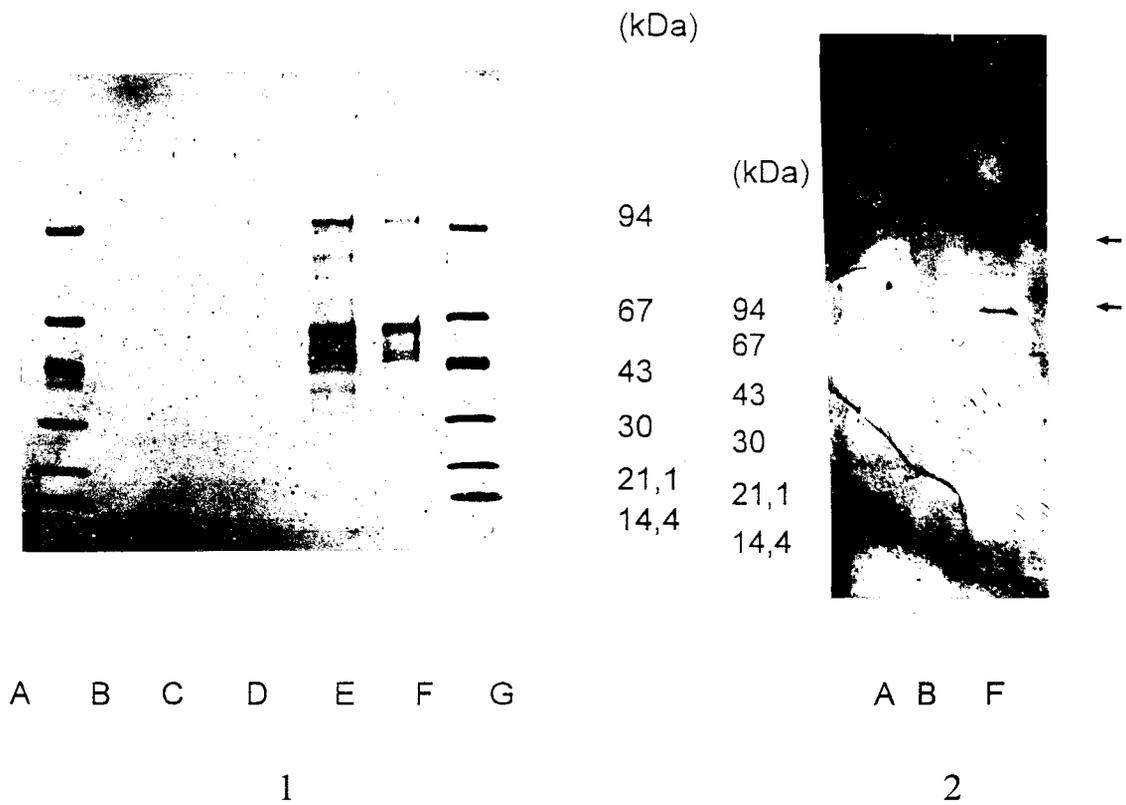
## 3-Influence des moyens de conservation de la souche

L'adhérence des bactéries varie en fonction de la température à laquelle elles sont conservées. On remarque que l'hydrophobicité est maximale au moment de la récolte des culots bactériens, par contre l'interaction spécifique avec les mucines augmente après un stockage de 48h à 37°C ou à 4°C. Cet effet se fait encore plus ressentir après un stockage à une température de -20°C. Les résultats sont rassemblés dans la figure 20, page 80.

A ce stade, on peut supposer que les enveloppes bactériennes subissent soit un début de lyse, soit un décapage lié à la congélation-décongélation. Ces traitements modifieraient l'agencement des protéines de la paroi bactérienne, activant ainsi les adhésines et les agglutinines de *B. bifidum*.

## Discussion

Cette technique ELISA nous a permis de mettre en évidence la forte hydrophobicité de surface des bifidobactéries. Cette propriété, mise en évidence par l'affinité de la bactérie au polystyrène, semble s'accroître avec l'âge de la culture : les bactéries en phase stationnaire de croissance sont très hydrophobes. Cette hydrophobicité serait susceptible de masquer la



**Figure 19 : Electrophorèse en milieu dénaturant du milieu de culture de *B. bifidum* (Croissance effectuée en fermenteur à pH régulé).**

1 : révélation au bleu de coomassie

2 : révélation par les mucines marquées (biotine/avidine-peroxydase)

A, G : témoins de masse moléculaire

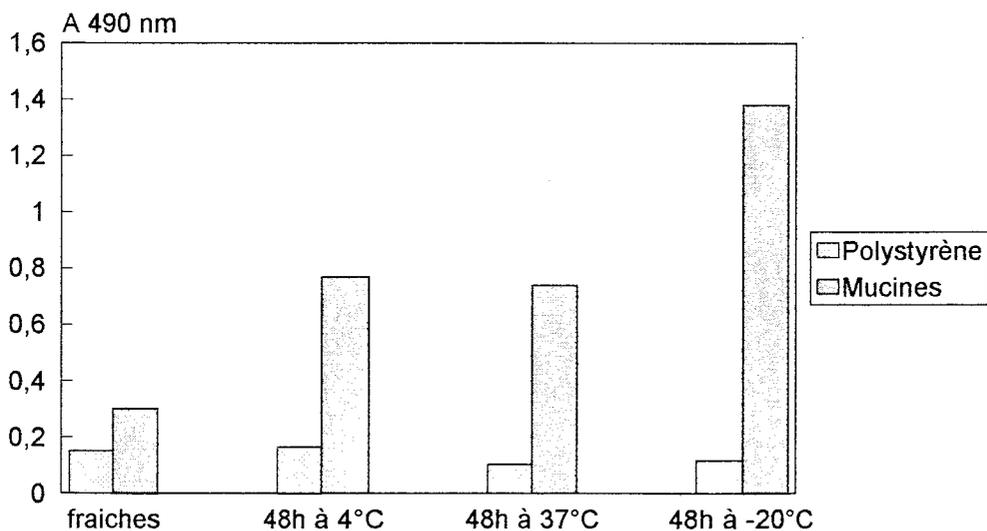
B : milieu de culture stérile

C : T=0

D : T=7 h

E : T=31 h

F : T=48h.



**Figure 20 : Influence de la température de conservation sur la spécificité d'adhérence de *B. bifidum*.**

Les bactéries récoltées en phase stationnaire de croissance subissent 48h de conservation à différentes températures. Les bactéries, lavées dans du PBS, sont ensuite réparties soit directement dans les puits de polystyrène, soit dans les puits préalablement recouverts de mucines. La fixation des bactéries aux différents supports est mesurée après un marquage indirecte à la peroxydase. Les résultats sont la moyenne de 5 expériences ou plus.

spécificité de la réaction d'adhérence aux mucines. Celle-ci peut être engendrée par les acides lipotéichoïques de surface ou par des structures polysaccharidiques présentes à la périphérie bactérienne. On observe nettement la présence de ces structures saccharidiques intra- et extracellulaires sur la figure 4, page 22.

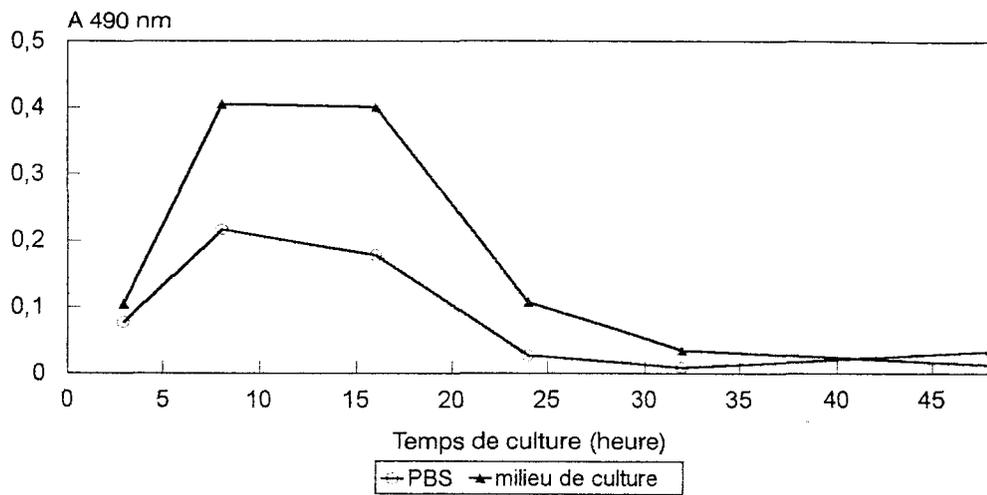
La variation d'adhérence au cours de la culture bactérienne peut également s'expliquer par la dénaturation des adhésines. En effet, le milieu de culture s'acidifie au cours de la croissance bactérienne, cette acidification provient de la fermentation des sucres par la bactérie. Cette hypothèse est renforcée par les études récentes de Mattarelli *et al.*, (1993) concernant les protéines bifidobactériennes associées à la surface (BIFOP) chez des souches de *Bifidobacterium globosum*. La synthèse de ces protéines semble être régulée par la température de croissance de ces bifidobactéries. Les conditions de culture auraient une répercussion sur la production de BIFOP, et pourraient influencer les différentes propriétés cellulaires liées à ces protéines. Le pH pourrait soit jouer sur la production des structures responsables de l'adhésion, soit dénaturer irréversiblement ces structures. On sait aussi depuis les travaux de Poupard *et al.*, 1973 que la morphologie des bifidobactéries varie en fonction des conditions de cultures, ce pléomorphisme pourrait également intervenir dans les propriétés adhérentes de la bactérie.

## **V-MISE EN ÉVIDENCE D'UNE INTERACTION CELLULES INTESTINALES-B. BIFIDUM**

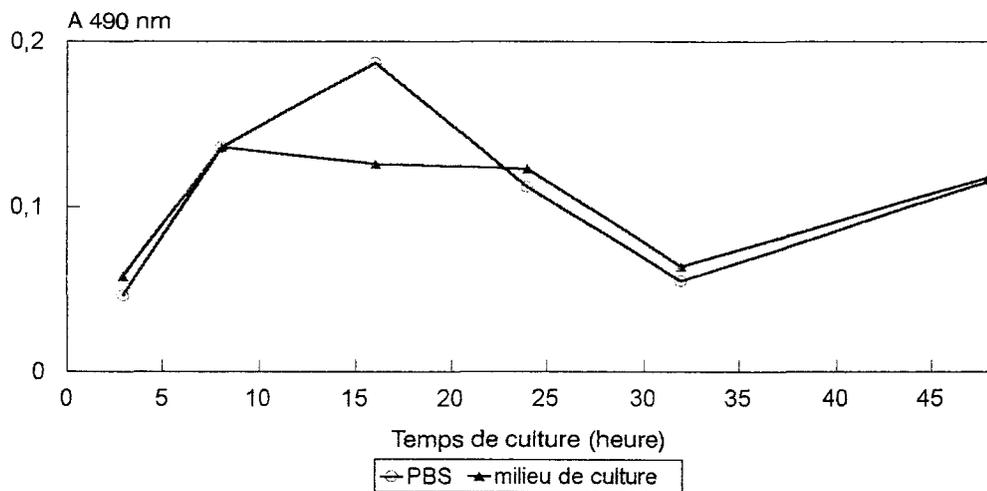
Nous avons étudié l'adhérence de *B. bifidum* à deux souches dérivant de carcinome humain, HT-29 et HT-29-MTX. La souche HT-29-MTX est sécrétrice de mucus. Cette étude a été réalisée sur des cellules directement cultivées dans des puits de polystyrène (figure 21, page 82).

*B. bifidum* est capable d'adhérer aux surfaces membranaires des cellules HT-29 et HT-29-MTX.

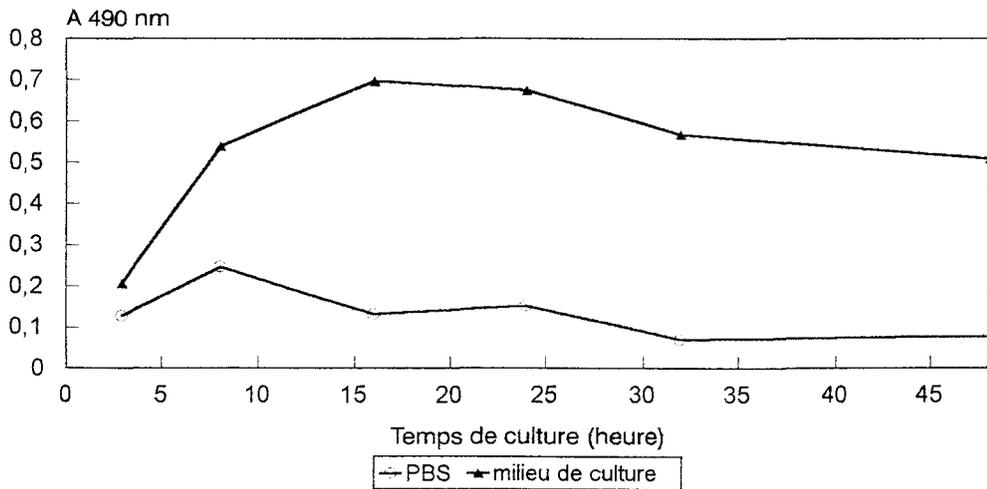
L'adhérence de *B. bifidum* aux cellules HT-29 est maximale pour un temps de culture de 8h. Ces résultats rappellent ceux obtenus sur mucines immobilisées. Par contre, la présence du milieu de culture favorise l'adhérence bactérienne.



### HT-29



### HT-29-MTX



### Polystyrène

**Figure 21: Adhérence de *B. bifidum* aux cellules HT-29 et HT-29-MTX en fonction du temps de culture; suivi de l'hydrophobicité bactérienne en fonction du temps de culture. Les bactéries sont testées après 3, 8, 16, 24, 32 et 48h de culture.**

Les bactéries semblent beaucoup plus affines pour les HT-29 que pour les HT-29-MTX. Ces résultats peuvent s'expliquer par l'élimination des mucines au cours des différents lavages accompagnant cette technique, entraînant ainsi les bactéries fixées sur ces mucines.

La présence du milieu de culture provoque une adhérence bactérienne de type hydrophobe (fixation au polystyrène). Cette hydrophobicité est constante pour des temps supérieurs à 15h alors que l'adhérence aux cellules HT-29 chute après 20h. Au cours de leur croissance, les bactéries relargueraient dans le milieu de culture deux types de molécule : une substance, qui en se combinant aux bactéries, augmente l'hydrophobicité bactérienne et une substance favorisant l'adhérence spécifique aux cellules intestinales. Pour des temps plus long, supérieurs à 24h, la chute de l'adhérence bactérienne pourrait s'expliquer par une lyse ou une dénaturation (pH acide) de cet intermédiaire d'adhésion.

## Discussion

L'adhérence de *B. bifidum* aux cellules de souches dérivant de carcinome humain HT-29 et HT-29-MTX est mise en évidence par une technique de type ELISA. Cette adhérence implique la participation de facteurs présents dans le milieu de culture. Ces résultats rejoignent les conclusions de Bernet *et al.* ( 1993) qui ont étudié l'adhésion de bifidobactéries d'origine humaines aux cellules épithéliales de l'intestin humain. Un facteur de nature protéique, présent dans le milieu de culture et à la surface de la bactérie servirait d'intermédiaire entre la bifidobactérie et la cellules intestinale. L'électrophorèse en SDS-PAGE du milieu de culture, suivi d'un marquage par des mucines biotinylées révèle des structures protéiques spécifiques de mucines. Le milieu de culture contient également des structures, protéiques ou non, provenant de la surface bactérienne, possédant une très forte hydrophobicité.

L'adhérence de *B. bifidum* aux cellules HT-29-MTX, sécrétrices de mucus, est beaucoup plus faible. L'explication est liée au test ELISA lui-même, mais peut être extrapolée *in vivo*. Les bactéries, fixées aux mucines des HT-29-MTX, sont éliminées par des lavages successifs. On peut imaginer que le même phénomène se produit à l'intérieur du tractus digestif où les mucines sont en perpétuel renouvellement, protégeant l'épithélium intestinal en piégeant et en éliminant les bactéries pathogènes. Ce phénomène permet en même temps d'expliquer le relargage des *B. bifidum* dans les fèces.

*B. bifidum* adhère donc directement aux cellules intestinales par l'intermédiaire d'un facteur de liaison relargué dans le milieu au cours de la culture. En phase stationnaire, l'adhérence chute. Celle-ci peut s'expliquer par une hydrolyse de ce facteur protéique. Par

contre, la présence du milieu de culture entraîne une hydrophobicité de la surface bactérienne : cette dernière reste constante même en phase stationnaire.

## **VI -CONCLUSIONS**

On peut déjà tirer de cette étude plusieurs conclusions :

-L'adhérence varie en fonction de l'âge de la bactérie, cela pourrait expliquer le renouvellement des bactéries au niveau intestinal. L'augmentation de l'hydrophobicité au niveau des enveloppes bactériennes doit certainement masquer des points d'interaction spécifique.

-L'adhérence aux mucines immobilisées, dans le cas d'une analyse par technique ELISA, est une réaction spécifique et intrinsèque à la bactérie.

-L'adhérence aux cellules intestinales (HT-29) nécessiterait la présence d'un intermédiaire d'adhésion présent dans le milieu de culture. Cette propriété peut découler du fait que les cellules HT-29 ne sont pas mucine-sécrétrices .

## **ADHESINES DE *BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM***

### **I-CARACTÉRISATION D'ADHÉSINES À LA SURFACE DE *B. BIFIDUM***

Lors d'études antérieures, nous avons montré que dans certaines conditions (sélection des souches, âge de la culture, conditions de culture), *B. bifidum* adhérait spécifiquement aux mucines. Cependant des interactions hydrophobes peuvent également intervenir et masquer ainsi cette adhésion spécifique. Pour pallier ces inconvénients, nous avons tenté de caractériser les structures qui sont susceptibles d'intervenir dans l'adhérence.

Avant de nous lancer dans un protocole de purification des adhésines bactériennes, nous avons observé le comportement des bactéries vis-à-vis des mucines après différents traitements

#### **A-ACTION DE LA TEMPÉRATURE**

Nous avons mis en évidence que la réaction d'adhésion était très sensible aux chocs thermiques. Après 5 min de chauffage à 100°C, il y a une perte de 70% de l'adhérence vis-à-

vis des mucines et une perte de l'ordre de 50% vis-à-vis du polystyrène. Pour un traitement thermique prolongé, il y a abolition totale de l'adhérence aux mucines, alors que l'interaction hydrophobe est stable. Pendant les 5 premières minutes, on peut remarquer que la dénaturation des glycosidases donne le même profil que la perte d'adhérence spécifique. Les résultats sont rassemblés dans la figure 22, page 86.

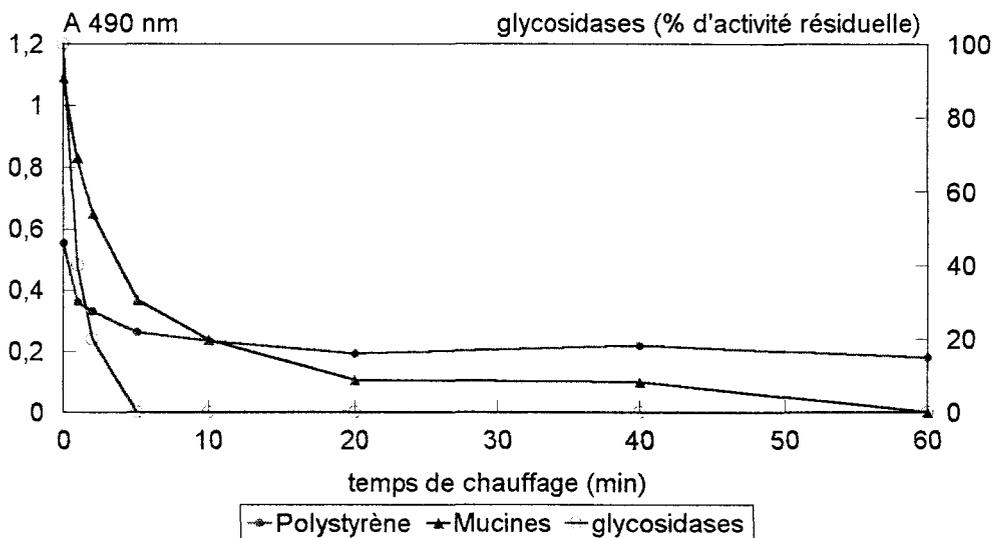
## B-ACTION DES PROTÉASES

L'hydrolyse protéolytique ménagée par la pronase entraîne une perte progressive des propriétés d'adhérence aux mucines (figure 23, page 86). Les activités glycosidasiques disparaissent avec un profil identique à celui de la perte d'adhésion. Par contre, l'interaction vis-à-vis du polystyrène étant très faible avec les bactéries non traitées, il semble hasardeux de formuler une conclusion, sur la nature protéique ou non des structures responsables des interactions hydrophobes. On peut néanmoins supposer à ce stade que des structures protéiques sont impliquées dans le mécanisme d'interaction de *B. bifidum* aux mucines

*B. bifidum* possèdent des glycosidases capables de dégrader les mucines. Après l'inactivation de ces enzymes par chauffage, la bactérie n'adhère plus aux mucines. Mais il est difficile de conclure à la participation des glycosidases dans l'adhérence aux mucines, les adhésines étant souvent de nature protéique.

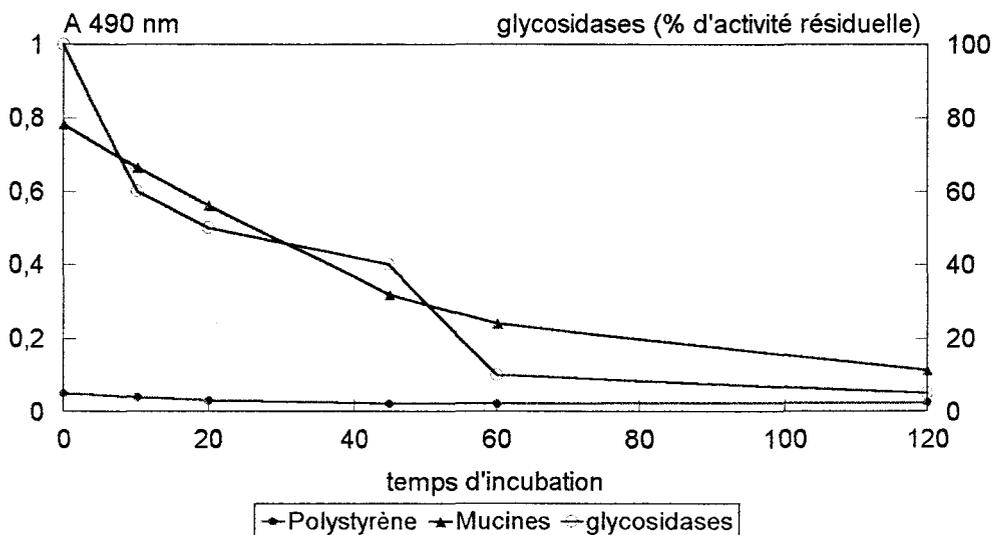
## C-AUTOLYSE DU SYSTÈME

La mise en suspension des bactéries après un cycle de congélation, dans un tampon de pH neutre (tampon Bis-Tris 50 mM, pH 6,8) entraîne l'apparition de structures protéiques dans les eaux de lavage. Ces structures peuvent être visualisées par SDS-PAGE, les résultats obtenus sont rassemblés dans la figure 24, page 87. Un simple lavage suffit à "décrocher" de nombreuses structures protéiques dont l'intensité des bandes en SDS-PAGE est proportionnelle à la durée de l'incubation. On retrouve sensiblement les mêmes profils électrophorétiques en présence de bactéries entières qu'en présence de structures membranaires obtenues après un traitement à la presse de French. Après avoir effectué un transfert et une visualisation par immunodétection, on remarque que certaines fractions sont reconnues par les mucines (figure 24, page 87). L'une de ces fractions, de faible poids



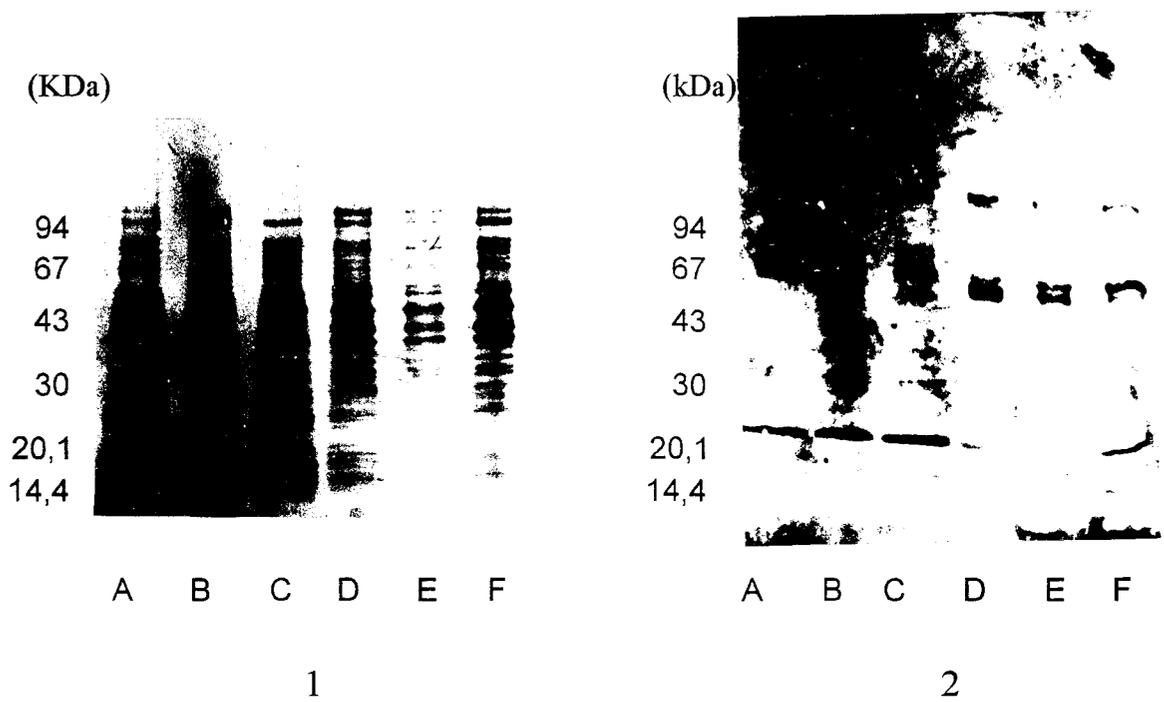
**Figure 22 : Modification des propriétés adhérentes et des activités glycosidasiques de *B. bifidum* après un choc thermique.**

La suspension bactérienne (1mg/ml dans du PBS) est plongée dans un bain-marie bouillant pendant des temps variant de 1 à 60 min. Le pourcentage d'activité glycosidasique se mesure par rapport aux bactéries non traitées. L'adhérence au polystyrène ou aux mucines immobilisées est mesurée par la technique ELISA. Les résultats sont exprimés en moyenne pour 5 expériences effectuées ou plus.



**Figure 23 : Modification des propriétés adhérentes et des activités glycosidasiques de *B. bifidum* au cours de l'hydrolyse protéasique.**

La suspension bactérienne (1mg/ml dans du PBS) est hydrolysée par la pronase en tampon Tris-HCl 10mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 7,8 et pour un rapport enzyme/ substrat = 1/100 (p/p). Le temps d'hydrolyse varie de 10 à 120 min. Le pourcentage d'activité glycosidasique se mesure par rapport aux bactéries non traitées. L'adhérence au polystyrène ou aux mucines immobilisées est mesurée par la technique ELISA. Les résultats sont exprimés en moyenne pour 5 expériences effectuées ou plus.



**Figure 24 : Electrophorèse en milieu dénaturant des surnageants obtenus après incubation de *B. bifidum* en tampon Bis-Tris 50 mM, pH 6,8 à 4°C,**

**A : lavage rapide**

**B : incubation 16 heures**

**C : incubation 35 heures**

**et des culots de *B. bifidum* après traitement à la presse de French,**

**D : lavage rapide**

**E : incubation 16 heures**

**F : incubation 35 heures.**

1 : révélation au bleu de coomassie

2 : révélation par les mucines marquées (biotine/avidine-peroxydase)

moléculaire apparaît plus intense dans les incubats de cellules entières. Les structures susceptibles de réagir avec la muqueuse intestinale se trouvent donc implantées au niveau membranaire en position externe. A partir de ces structures membranaires, nous allons tenter d'isoler et de purifier ces adhésines.

## **II-PREPARATION DES ADHESINES**

Pour l'obtention des adhésines, nous sommes partis de plusieurs observations.

La première observation nous a montré qu'il y avait un phénomène de relargage naturel de structures présentant une affinité pour les mucines.

La deuxième observation a mis en évidence que les structures adhérentes sont localisées au niveau membranaire.

Enfin la dernière, nous a permis de montrer qu'après action de la pronase E sur des bactéries entières, on enregistrait une perte de l'adhérence des bactéries vis-à-vis des mucines

Cet ensemble de résultats nous a amené à envisager le traitement de la bactérie par différents moyens. D'une part, l'extraction de structure membranaire par l'utilisation des détergents et d'autre part, le traitement par une protéolyse ménagée.

Les résultats de ces différents traitements sont analysés par la mesure de l'adhérence des bactéries traitées et des structures relarguées au cours du traitement.

### **A-SOLUBILISATION DES ADHÉSINES PAR LES DÉTERGENTS**

Quant on soumet des bactéries entières, ayant subies un cycle de congélation, à l'action des différents détergents, seuls le Zwittergent 3-16 et le Dodécyl- $\beta$ -D-maltoside donnent des résultats intéressants. Quant on examine les propriétés d'adhérence de la bactérie, on remarque une perte légère de l'interaction avec le polystyrène et une forte diminution de l'adhérence aux mucines. Cette perte est de l'ordre de 20 à 30% (tableau V, page 89).

Cette perte d'adhésion de la bactérie devrait se répercuter par une augmentation de structures solubles adhérentes dans le surnageant d'extraction. On remarque bien une augmentation de l'adhérence que ce soit au niveau du polystyrène avec un facteur de l'ordre de 6 à 7 et aux mucines avec un facteur de l'ordre de 2.

A la vue de ces résultats, nous avons pensé que l'augmentation de l'adhérence au polystyrène pouvait être liée à la présence de traces de détergent. Bien que les solutions d'extraction soient dialysées pendant longtemps (48h à 4°C), il se pourrait que le détergent ne

**Tableau V: Mesure de l'adhérence de *B. bifidum* après traitement par les détergents.**

Adhérence bactérienne (A 490 nm)				
bactérie	culot (10 <sup>6</sup> cellules/ml)		sumageant (2 mg/ml)	
	Polystyrène	Mucines	Polystyrène	Mucines
bacteries non traitées <sup>a</sup>	0,090 ± 0,006	0,943 ± 0,046	0,080 ± 0,01	0,192 ± 0,015
Zwittergent 3-16	0,058 ± 0,014	0,720 ± 0,048	0,491 ± 0,015	0,450 ± 0,025
Dodecyl-β-D maltoside	0,064 ± 0,01	0,633 ± 0,034	0,617 ± 0,023	0,518 ± 0,009
bacteries non traitées <sup>b</sup>	0,080 ± 0,005	1,043 ± 0,072	0,075 ± 0,017	0,115 ± 0,025
Octyl-β-D glucopyranoside	0,075 ± 0,008	0,910 ± 0,079	0,050 ± 0,015	0,110 ± 0,020

Les bactéries, après un cycle de congélation et de décongélation, sont traitées pendant 25 min par le Zwittergent 3-16, le Dodecyl-β-D maltoside (0,1% p/p) et par l'Octyl-β-D glucopyranoside (1% p/p). Les bactéries de référence sont incubées soit dans un tampon <sup>a</sup> citrate-phosphate de sodium 50 mM, pH 5,4, PMSF 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 150 mM, soit dans un tampon <sup>b</sup> Hepes-Tris 20 mM, pH 7,2, EDTA 0,2 mM, KCl 150 mM. Les résultats sont exprimés en moyenne ± l'erreur standard sur la moyenne pour n = 5 ou plus.

soit pas complètement éliminé. En effet, les concentrations micellaires critiques (CMC) de ces produits sont faibles, ce qui rend difficile l'élimination totale du détergent. A cet égard, nous avons testé un autre détergent possédant une CMC élevée : l'Octyl- $\beta$ -D-glucopyranoside. Ce dernier est complètement éliminé après une dialyse de 48h à 4°C. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau V, page 89. On remarque malheureusement que dans nos conditions expérimentales, ce détergent, même s'il solubilise des structures membranaires n'altère en rien l'adhérence des bactéries aux mucines.

D'autre part, la présence de détergent (Zwittergent 3-16 et le Dodécyl- $\beta$ -D-maltoside) ajouté à une suspension bactérienne ne modifie pas le comportement des bactéries vis-à-vis des mucines ou du polystyrène, même à des concentrations de l'ordre de 10mg/ml. L'hydrophobicité des extraits n'est donc pas liée à la présence de détergent résiduel.

Lorsqu'on étudie, par la technique ELISA, la spécificité d'adhérence aux mucines de la fraction solubilisée à partir de bactéries congelées traitées par les détergents, on s'aperçoit que les structures solubilisées se fixent aussi bien sur les mucines que sur le polystyrène (tableau V, page 89). Dans ce cas, les interactions doivent être de type hydrophobe, car on utilise généralement le polystyrène comme support standard pour l'étude de l'hydrophobicité de surface.

Nous avons donc essayé de déterminer la part de spécificité intervenant dans la fixation de ces extraits aux mucines immobilisées. L'adhérence, aux mucines, de la bactérie non traitée est inhibée à 80% par ces mêmes mucines en solution, par contre la fixation au polystyrène n'est pas modifiée. Ces mêmes mucines inhibent faiblement la fixation des extraits aussi bien aux mucines qu'au polystyrène (Tableau VI, page 91).

Nous pouvons conclure que les structures obtenues après extraction aux détergents n'interviennent pas dans les interactions spécifiques avec les mucines.

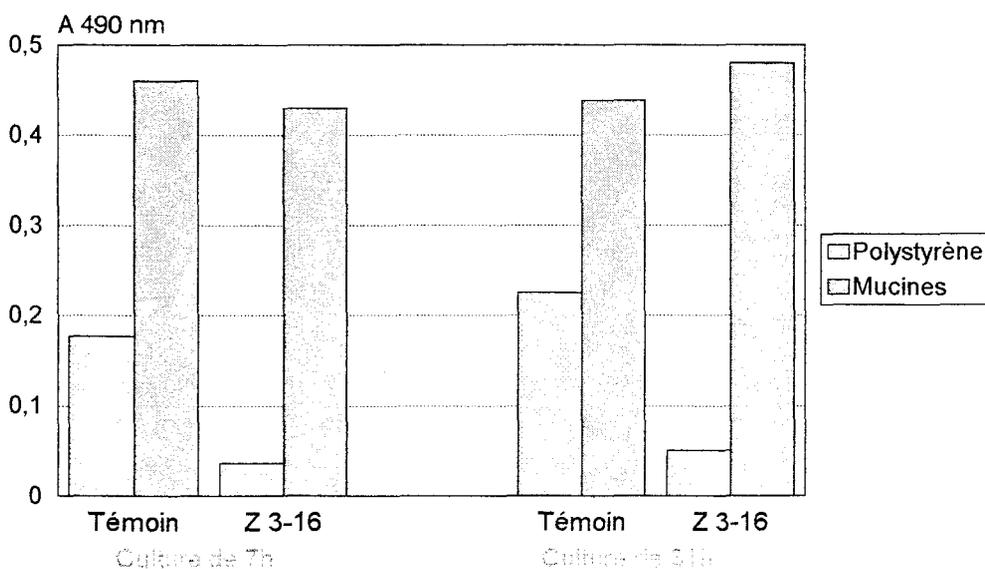
On peut comparer les résultats obtenus à partir de bactéries ayant subies un cycle de congélation à ceux obtenus avec des cultures bactériennes non congelées. Les bactéries directement issues d'une culture en fermenteur présentent une hydrophobicité beaucoup plus importante que celle observée après un traitement de congélation/décongélation (figure 20, page 80). Un traitement doux au Zwittergent 3-16 appliqué à ces bactéries ne modifie pas l'interaction avec les mucines mais diminue fortement l'adsorption au polystyrène (figure 25, page 91).

**Tableau VI: Inhibition par les mucines de la fixation des extraits membranaires au polystyrène et aux mucines immobilisées.**

Inhibition de l'adhérence bactérienne (% d'inhibition) : <sup>a</sup>		
support		
	Polystyrène	Mucines
<i>B. bifidum</i>	13 ± 2	90 ± 11
extraits bactériens	35 ± 3	49 ± 9

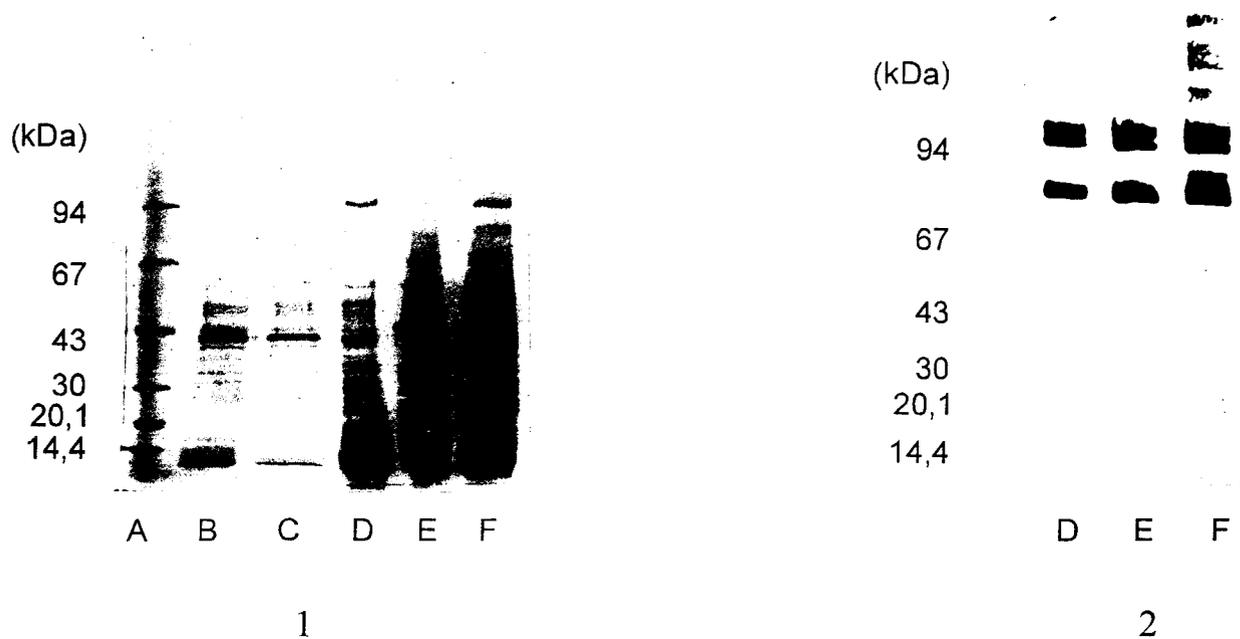
Les bactéries ( $10^6$  cellules/ml) et les extraits bactériens (3 mg/ml) solubilisés par les détergents sont incubés dans un tampon PBS contenant 5 mg/ml de mucines gastriques de Porc pendant 1h à 37°C, avant le test ELISA.

<sup>a</sup> le % d'inhibition est calculé de la façon suivante :  $(A_{490}$  du témoin -  $A_{490}$  en présence de mucines) x 100/ $A_{490}$  du témoin). Les résultats sont exprimés en moyenne ± l'erreur standard sur la moyenne pour n=5 ou plus.



**Figure 25 : Influence d'un traitement doux par le Zwittergent 3-16 sur la spécificité d'adhérence de *B. bifidum* DSM 20082 .**

Après 7h et 24h de culture, les bactéries sont traitées par le Zwittergent 3-16 (15 min) et incubées soit directement dans les puits de polystyrène, soit dans les puits saturés en mucines. L'adhérence est ensuite mesurée par un marquage indirect à la peroxydase. Les résultats sont la moyenne de 5 expériences ou plus.



**Figure 26 : Electrophorèse en milieu dénaturant des protéines de la surface de *B. bifidum* extraites par les détergents.**

1 : révélation au bleu de coomassie

2 : révélation par les mucines marquées (biotine/avidine-peroxydase)

A : témoin de masse moléculaire

B : surnageant d'incubation des bactéries en tampon Hepes-Tris 50 mM, pH 7,4

C : extrait bactérien solubilisé par l'octyl- $\beta$ -D-glucopyranoside

D : surnageant d'incubation des bactéries en tampon citrate-phosphate 50 mM, pH 5,4

E : extrait bactérien solubilisé par le zwittergent 3-16

F : extrait bactérien solubilisé par le Dodecyl- $\beta$ -D-maltoside.

## B-ANALYSE DES PRODUITS APRÈS EXTRACTION PAR LES DÉTERGENTS.

Les extraits sont analysés par SDS-PAGE et révélation au bleu de Coomassie. Les structures peptidiques obtenues, de masse moléculaire élevée, représentent 10% du poids recueilli après dialyse et lyophilisation. On remarque (figure 26, page 93) que l'octyl- $\beta$ -D glucopyranoside ne modifie pas la composition de l'extrait quand on le compare à un témoin incubé dans les mêmes conditions mais sans détergent. Ces résultats confirment ceux obtenus avec la technique ELISA et rendent inutilisable ce détergent pour extraire les adhésines.

Avec les autres détergents, on remarque que le système d'incubation permet de solubiliser des produits de faible masse moléculaire ( $\leq 14$ kDa). L'action de ces détergents se traduit par une solubilisation plus importante de molécules dont les masses moléculaires s'étagent entre 14 et 43 kDa. On remarque surtout une intensification des bandes dans la région de 43 kDa. L'électrotransfert sur feuille de nitrocellulose, après SDS-PAGE, suivi d'une détection à l'aide de mucines biotinylées révèle 3 bandes majeures à 74, 95 et 107 kDa, ainsi que des bandes mineures dont les masses moléculaires sont supérieures à 100 kDa. Ces bandes ne sont pas sélectivement obtenues par les détergents car elles sont également présentes dans le témoin d'incubation. Ces résultats sont représentés dans la figure 26, page 93. Comme cette technologie n'est pas spécifique de la solubilisation des structures reconnaissant les mucines, nous avons expérimenté l'hydrolyse protéique.

## C-PROTÉOLYSE DES BIFIDOBACTÉRIES

Deux systèmes enzymatiques sont utilisés : la pronase et la pancréatine. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau VII, page 94.

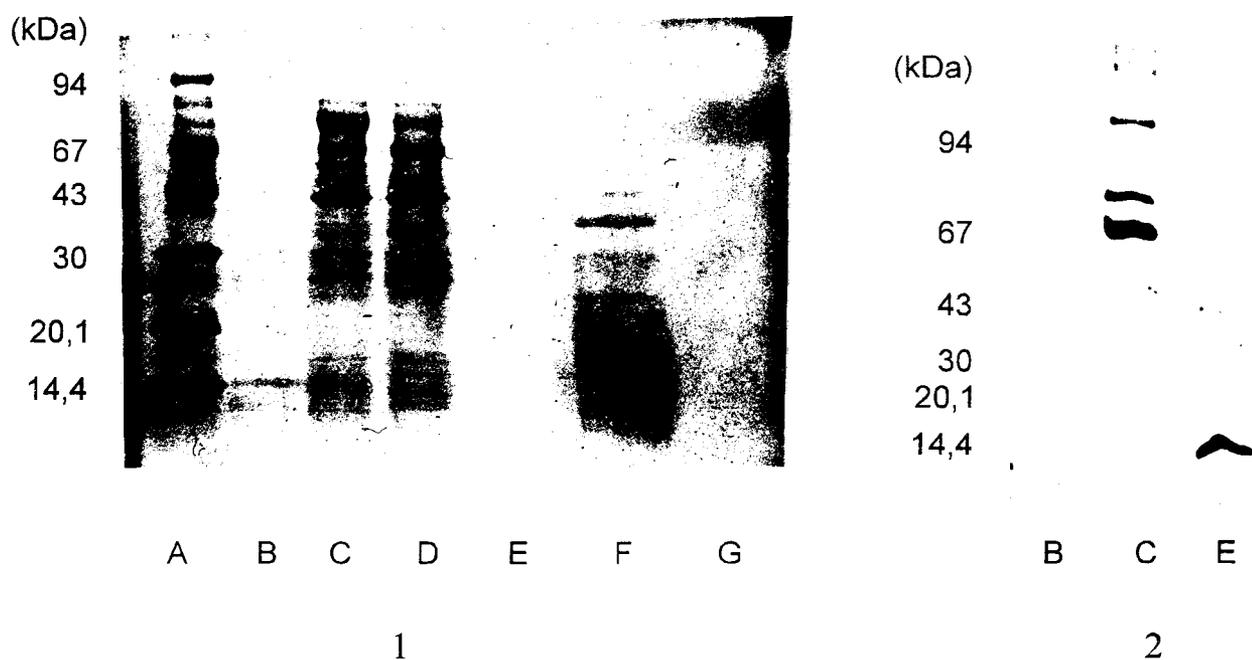
L'action de la pronase entraîne une perte importante de l'adhérence des bactéries vis-à-vis des mucines (perte de 70% après 1 heure d'incubation à 4°C). Le surnageant provenant de l'hydrolysate ne présente pas de réaction d'adhésion en technique ELISA. L'électrophorèse du surnageant (figure 27, page 95) met en évidence une hydrolyse très importante des structures obtenues à partir des enveloppes, il n'est possible de visualiser que des structures de faible masse moléculaire. Par la suite, il ne nous a pas été possible de maîtriser complètement la protéolyse des structures protéiques des enveloppes de *B. bifidum*, ni en jouant sur la concentration en enzyme, ni en jouant sur le couple temps-température.

Nous avons donc choisi la protéolyse par la pancréatine. Ce choix est dicté par le fait que les bifidobactéries sont susceptibles de se retrouver *in vivo* en présence des enzymes

**Tableau VII: Altération des propriétés adhérentes de *B. bifidum* par un traitement protéasique.**

Adhérence (A 490 nm)				
bactérie	culot (10 <sup>6</sup> cellules/ml)		surageant (2 mg/ml)	
	Polystyrène	Mucines	Polystyrène	Mucines
bactéries non traitées	0,082 ± 0,011	1,050 ± 0,019	0,083 ± 0,010	0,092 ± 0,009
Pronase	0,030 ± 0,005	0,386 ± 0,020	0,050 ± 0,011	0,080 ± 0,001
Pancréatine	0,025 ± 0,008	0,944 ± 0,035	0,017 ± 0,008	0,268 ± 0,0015

Les bactéries sont traitées par la pronase (1% p/p) et la pancréatine (1% p/p). Les bactéries de références sont incubées dans un tampon Tris-HCl 10mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 7,8. Les résultats sont exprimés en moyenne ± l'erreur standard sur la moyenne pour n = 5 ou plus.



**Figure 27 : Electrophorèse en milieu dénaturant des protéines de la surface de *B. bifidum* obtenues par traitement protéasique.**

1 : révélation au bleu de coomassie

2 : révélation par les mucines marquées (biotine/avidine-peroxydase)

A : témoin de masse moléculaire

B : surnageant d'incubation des bactéries en tampon Tris-HCl 10 mM, pH 7,8

C : extrait bactérien après 1 h d'hydrolyse par la pancréatine (E/S = 1/1000)

D : extrait bactérien après 1 h d'hydrolyse par la pancréatine (E/S = 1/500)

E : pancréatine au 1/500 en tampon Tris-HCl 10 mM, pH 7,8

F : extrait bactérien après 1 h d'hydrolyse par la pronase (E/S = 1/1000)

G : pronase au 1/1000 en tampon Tris-HCl 10 mM, pH 7,8.

pancréatiques. Ce mélange d'enzymes a été utilisé dans les conditions optimales d'action des protéases. Après un temps de contact de 1 heure à 37°C, on observe une chute statistiquement significative de l'adhérence des bactéries aux mucines (tableau VII, page 94), et il est possible de caractériser une adhérence au niveau du surnageant qui est différente de celle obtenue vis-à-vis du polystyrène. L'analyse du surnageant en SDS-PAGE (figure 27, page 95) met en évidence des structures de masse moléculaire élevée (> 43 kDa). La révélation par les mucines après électrotransfert caractérise deux bandes majeures à 74 et 92 kDa ainsi que des bandes possédant des masses supérieures à 94 kDa .

## Discussion

L'adhérence aux mucines, étudiée par la technique ELISA, semble bien résulter de l'action de structures intrinsèques à la surface membranaire de *B. bifidum*. La présence du milieu de culture n'augmente pas l'adhérence bactérienne aux mucines. Ces structures, sensibles aux traitements thermiques et à l'hydrolyse protéasique, sont de nature protéique.

Deux techniques ont été utilisées pour l'isolement de ces protéines.

Les détergents, de part leur propriétés physico-chimiques, ont été utilisés pour solubiliser ces protéines membranaires. Un traitement doux réalisé sur des bactéries relativement hydrophobes, entraîne une solubilisation de structures hydrophobes, responsables de l'adhérence au polystyrène, un traitement plus drastique touche des structures responsables de l'adhérence aux mucines. Mais dans les deux cas, les structures extraites présentent une forte hydrophobicité.

Cette hydrophobicité peut être le reflet du caractère hydrophobe du matériel extrait (dérivé lipidique, glycolipidique) ou de la modification des activités de fixation engendrée par une modification de la conformation spatiale (déplissement) des structures isolées. Le matériel solubilisé est de nature protéique. Les traces de détergent qui accompagnent le matériel extrait ne peuvent à elles seules expliquer, par leur interférence, le faible taux de protéine qui est de l'ordre de 10% (P/P) exprimé par rapport à la matière sèche. Ces observations tendent à conforter l'hypothèse émise par Op den Camp (1985a) concernant l'intervention des acides lipotéichoïques dans l'adhérence de *B. bifidum* aux mucines intestinales

*B. bifidum* possèdent néanmoins des structures protéiques membranaires, reconnues par les mucines, qui sont libérées dans le milieu par une simple incubation en milieu agité. Ces structures peuvent également être isolées de l'enveloppe bactérienne par l'utilisation de

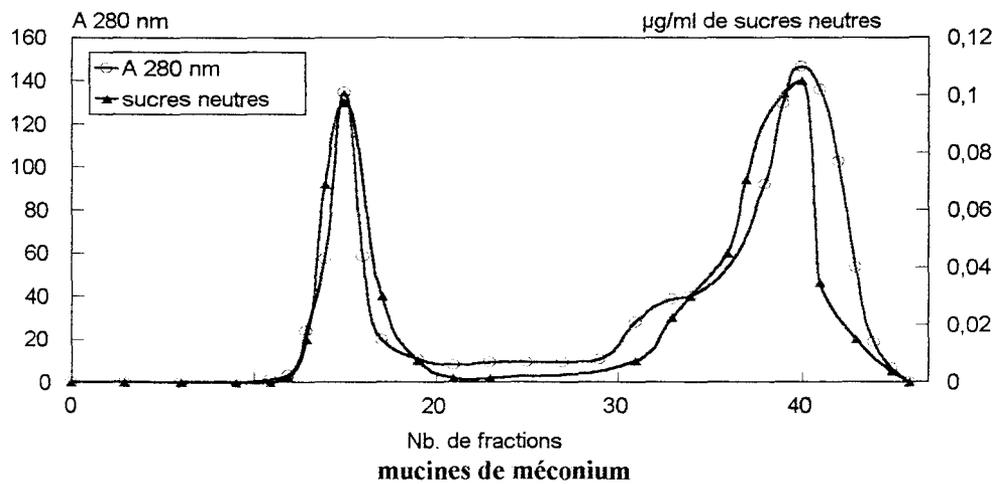
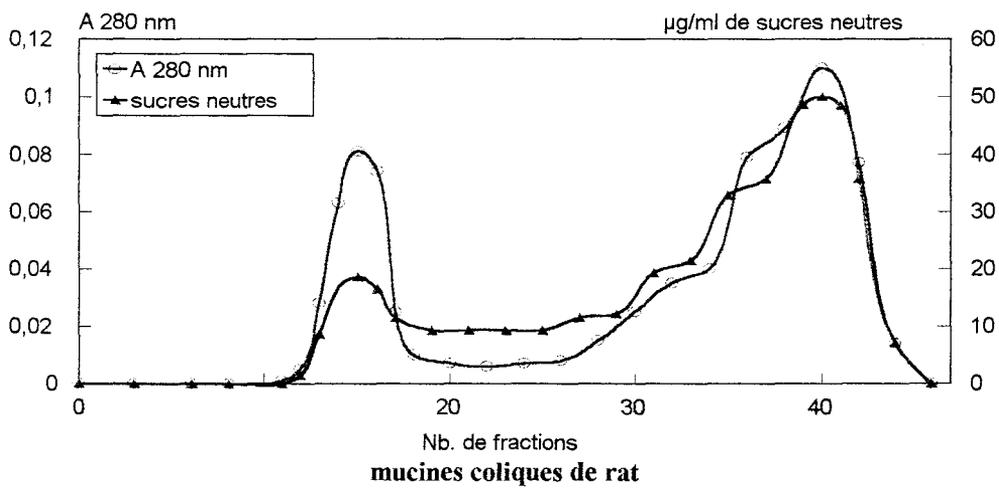
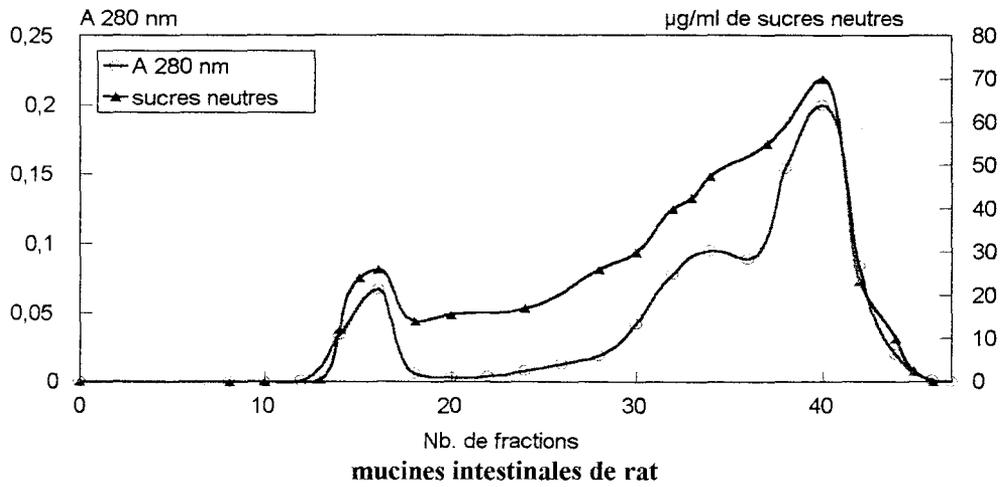
protéases à spectre d'action large. Nous avons utilisé les protéases de *Streptomyces griseus* : la pronase E et les enzymes excrétées par le pancréas de Porc : la pancréatine. Pour celle-ci, nous nous sommes placés dans les conditions d'optimisation des activités protéasiques au détriment des autres activités enzymatiques (lipase, ribonucléase et  $\alpha$ -amylase). La pronase est beaucoup trop active pour être utilisée dans les conditions décrites. Par contre, par action de la pancréatine, nous avons décroché de la surface membranaire des structures révélées par des mucines marquées après SDS-PAGE et électrotransfert sur feuille de nitrocellulose.

Par les deux techniques, les protéines isolées possèdent un poids moléculaire élevé et ne sont étudiées qu'après dénaturation. Lorsque l'on observe ces bactéries, en microscopie optique, après traitement aux protéases, on remarque une modification de leur morphologie. De nombreuses bactéries apparaissent non plus sous forme de bâtonnet, mais sous forme arrondie. Ces protéines participeraient également au maintien de la rigidité de la paroi bactérienne. *Bifidobacterium bifidum* étant une bactérie gram positive, ces protéines peuvent être isolées aussi bien de la paroi que de la couche S. Aucun des traitements utilisés ne semble vraiment efficace, pour extraire plus particulièrement les structures responsables de l'adhérence bactérienne.

## **CARACTÉRISATION DU SITE RECEPTEUR DES ADHÉSINES ET AGGLUTININES**

### **I- PURIFICATION DE MUCINES**

La gel filtration permet la purification partielle des mucines à partir des différents mucus. Après centrifugation, tous les débris cellulaires sont éliminés, il ne reste plus que les composés solubles. Les mucines représentant par définition des glycoprotéines de hauts poids moléculaires, on ne récupère que la fraction glycoprotéinique exclue au volume mort de la colonne de sepharose 4B (figure 28, page 98). Les mucines préparées à partir des intestins de Rat possèdent des pourcentages en sucres très faibles (4% pour les mucines intestinales et 2% pour les mucines coliques après dosage des oses neutres). La préparation de départ, obtenue après "grattage" des intestins lavés de Rat, est fortement contaminée par des débris cellulaires. Le pourcentage en sucres des mucines purifiées à partir du méconium est d'environ 30%.



**Figure 28 : Profil de purification de mucines sur Sepharose 4B.**

Tampon : Tris-HCl 10 mM; pH 7,8, injection : 60 mg; débit : 1,6 ml /min

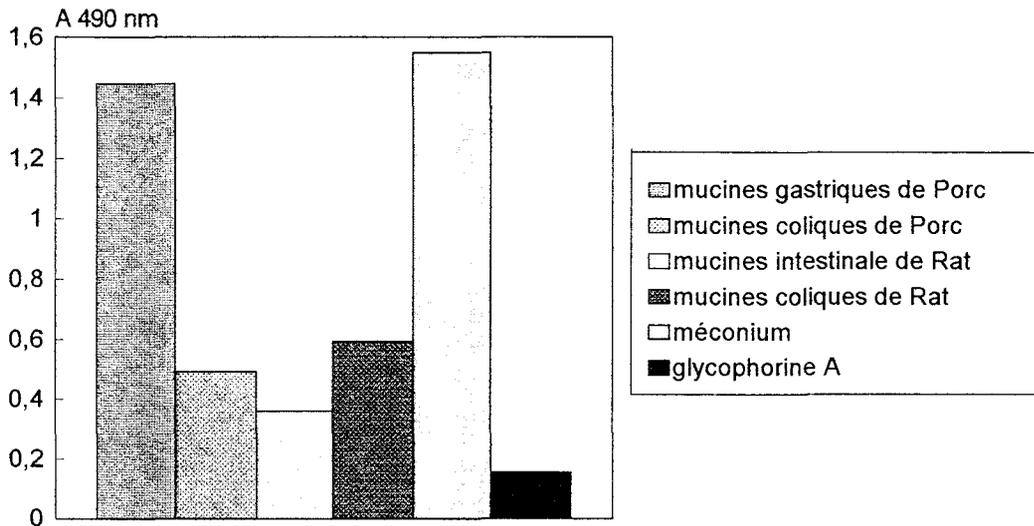
## II-VARIATION DU TAUX D'ADHÉRENCE SELON LA NATURE DES GLYCOPROTÉINES IMMOBILISÉES.

L'absorbance à 490 nm étant proportionnelle à la quantité de bactéries fixées, on observe une plus grande affinité des bactéries pour les mucines gastriques de Porc et les mucines isolées du méconium. Cette affinité est variable pour une même espèce animale en fonction de l'origine organique de ces mucines : les bifidobactéries possèdent une plus grande affinité pour les mucines gastriques de Porc que pour les mucines coliques de Porc (figure 29, page 100). La fixation est très importante sur les mucines de méconium, mucines rencontrées dans le colon du nouveau-né. On observe également une faible adhérence sur la glycophorine A immobilisée (O- et N-glycosylprotéine présente à la surface des hématies). Les bactéries semblent se fixer plus fortement sur les O-glycosylprotéines possédant un pourcentage important d'oses. Aucune adhérence spécifique n'est obtenue sur des N-glycosylprotéines comme l'ovalbumine ou la lactotransferrine humaine.

## III-VARIATION DE L'ACTIVITÉ GLYCOSIDASIQUE EN FONCTION DE L'ORIGINE DES MUCINES



*B. bifidum* possède toute une batterie de glycosidases, ces activités sont aussi bien localisées à l'intérieur de la bactérie qu'à la surface des enveloppes. Les différentes mucines, supports de l'adhérence bactérienne après immobilisation, sont mises en contact avec les glycosidases de *B. bifidum*. La nature des saccharides relargués diffère selon la nature des mucines (figure 30, page 100). La structure des sucres libérés après l'hydrolyse des mucines gastriques de Porc, a particulièrement été étudiée dans le laboratoire (Dron, 1992). Différents sucres peuvent être détectés après hydrolyse des mucines gastriques de Porc par *B. bifidum* et séparation sur TSK HW 40S : Gal, Fuc,  $\beta$ -D-Gal (1,3) GalNAc et  $\beta$ -D-Gal (1,3) GlcNAc et Gal-1P. L'acide N-acétyl-neuraminique, la N-acetylglucosamine et la N-acetylgalactosamine sont également libérés par hydrolyse. Ces produits ne sont pas détectés en CCM après révélation par l'orcinol sulfurique. Lorsqu'on change de substrat, on observe après CCM et détection à l'orcinol, la libération de galactose pour les mucines de Rat, de galactose et de produits migrant comme des disaccharides pour les mucines de méconium et de galactose et de produits migrant comme des disaccharides ou des trisaccharides pour les mucines coliques de Porc .



**Figure 29 : Adhérence de *B. bifidum* en fonction de l'origine des glycosylprotéines immobilisées.**

Les différentes solutions de mucines sont immobilisées sur plaques de polystyrène (concentration : 10 µg/ml). La quantité de bactéries fixées est dosée par un marquage indirect à la peroxydase. Les résultats sont exprimés en moyenne pour 5 expérimentations ou plus.



**Figure 30 : Hydrolyse de différentes O-glycosylprotéines par *B. bifidum***

- A : galactose témoin
- B : mucines gastriques de porc
- C : mucines coliques de porc
- D : fucose témoin
- E : mucines coliques de rat
- F : mucines intestinales de rat
- G : galactose et fucose témoins
- H : méconium
- I : témoin enzymes.

## IV-INHIBITION DE L'ADHÉRENCE ET DE L'HÉMAGGLUTINATION PAR DIFFÉRENTES STRUCTURES SACCHARIDIQUES.

### A-SPECIFICITE DE LA REACTION D'HEMAGGLUTINATION

Les cellules de *Bifidobacterium bifidum* souche AA 2/2 et souche DSM 20082, provoquent aussi bien l'agglutination des hématies de Lapin que celle des hématies humaines. Le seuil d'hémagglutination est identique quelque soit le groupe sanguin ou le rhésus des hématies étudiées (A, B, et O). Cette réaction n'est donc pas dépendante des motifs saccharidiques spécifiques à chaque groupe sanguin.

### B-INHIBITION DE L'HÉMAGGLUTINATION

Les résultats sont rassemblés dans le tableau VIII, page 102. Comme on peut le voir, l'incubation des bifidobactéries avec des structures glycoprotéïques de type mucines entraîne une inhibition de la réaction d'agglutination des hématies de Lapin. Cette hémagglutination est également inhibée par la glycophorine A (glycoprotéine de la membrane érythrocytaire).

Comme l'agglutination résulte souvent d'interaction de type lectine/sucre, nous avons tenté de déterminer la spécificité des agglutinines de *B. bifidum*. La méthode la plus employée et la plus simple est l'inhibition de cette réaction par la saturation des sites récepteurs.

Nous avons choisi dans un premier temps de tester les saccharides qui entrent dans la structure des mucines : Les mono- et disaccharides libérés par l'hydrolyse des mucines gastriques de Porc par les endo- et exoglycosidases de *B. bifidum* et les oligosaccharides obtenus après traitement des mucines par  $\beta$ -élimination.

Nous avons d'autre part testé des tétrasaccharides présents dans le lait de Femme : les lacto-N-tétraose et lacto-N-néo-tétraose sialylé ou non. Seules ces dernières structures sont susceptibles d'inhiber la réaction d'hémagglutination. Il faut aussi noter que la présence d'une liaison  $\beta$ 1-3 augmente le pouvoir inhibiteur et que l'acide N-acétyl neuraminique ne le modifie pas. Les autres structures saccharidiques testées sont sans action sur la réaction d'interaction.

### Discussion

Dans la première partie de ce mémoire, nous avons mis en évidence les propriétés agglutinantes de *B. bifidum* vis-à-vis des hématies de Lapin et des hématies humaines de tous

**Tableau VIII : Inhibition de l'activité hémagglutinante de *B. bifidum*.**

Inhibiteurs	concentration minimale inhibitrice de l'hémagglutination en µg/ml
mucines gastriques de porc	42 ± 12
mucines intestinales de rat	12,6 ± 8,8
mucines coliques de rat	845 ± 280
glycophorine A	97 ± 21
lacto-N-tétraose	244 ± 39
lacto-N-néo tétraose	88 ± 33
sialyl lacto-N-néo tétraose	88 ± 33

Les bactéries ( $10^6$  bactéries/ml), en suspension dans du PBS contenant différentes concentrations en glycoprotéines inhibitrices, sont incubées 1 h à 37°C avant d'être mises en contact avec des hématies de Lapin à 2% dans du PBS. La concentration inhibitrice représente la concentration qui provoque une sédimentation des érythrocytes dans les puits de microtitration.

groupes sanguins. Les propriétés hémagglutinantes de *B. bifidum* semblent indépendante de la structure des antigènes de surface des hématies.

Néanmoins, l'intervention des structures saccharidiques dans l'hémagglutination est ici démontrée par les expériences d'inhibition engendrées par des tétrasaccharides présents dans le lait de Femme. Ces tétrasaccharides renferment dans leur structure les unités disaccharidiques de base des déterminants antigéniques de groupes sanguins (type 1 et type 2).

Disaccharides de base des déterminants antigéniques de groupes sanguins :

$\beta$ -D-Gal (1,3)GlcNAc

type 1

$\beta$ -D-Gal (1,4)GlcNAc

type 2

Structure des tétrasaccharides isolés du lait de femme :

$\beta$ Gal (1,3) $\beta$ GlcNAc(1,3) $\beta$ Gal(1,4)Glc

Lacto-N-tétraose

$\beta$ Gal (1,4) $\beta$ GlcNAc(1,3) $\beta$ Gal(1,4)Glc

Lacto néo-N-tétraose

$\alpha$ NeuNAc (1,6) $\beta$ Gal (1,4) $\beta$ GlcNAc(1,3) $\beta$ Gal(1,4)Glc

Sialyl Lacto néo-N-tétraose

On peut émettre l'hypothèse que comme *Pseudomonas aeruginosa*, *B. bifidum* reconnaîtrait spécifiquement les oligosaccharides contenant les disaccharides de base communs aux érythrocytes de Lapin et aux érythrocytes humains de tous groupes sanguins.

Ces déterminants antigéniques de groupes sanguins sont également présents dans la composition des mucines, en particulier dans la structure des mucines gastriques de Porc et des mucines de Rat. Cela expliquerait l'inhibition de l'hémagglutination par ces mucines. Les résultats d'inhibition par les différentes mucines montrent une différence de spécificité de fixation selon l'origine des mucines, mais cette différence ne s'explique pas uniquement par la variation du pourcentage en saccharides de ces mucines.

## C-INHIBITION DE L'ADHÉRENCE

### 1-Inhibition de l'adhérence par des glycoprotéines

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau IX, page 104. Des concentrations très faibles en mucines gastriques de Porc (3,5-17,5  $\mu$ g/ml) sont suffisantes pour obtenir une

**Tableau IX : Inhibition de l'adhérence de *B. bifidum* aux glycoprotéines immobilisées.**

Inhibiteurs	concentration inhibitrice de l'adhérence aux glycoprotéines en $\mu\text{g/ml}^{\text{a}}$	concentration inhibitrice de l'adhérence aux mucines en $\mu\text{g/ml}^{\text{b}}$
mucines gastriques de porc	10,5 ± 7	10,5 ± 7
mucines coliques de porc	ND	750 ± 20
mucines intestinales de rat	51 ± 26	1250 ± 45
mucines coliques de rat	69 ± 16,7	750 ± 35
méconium	7,5 ± 2	8,75 ± 3
mucines sous-maxillaires de boeuf	ND	500 ± 40
glycophorine A	67 ± 24	ND
lacto-N-tétraose	ND	4400 ± 960
lacto-N-néo tétraose	ND	2583 ± 520
sialyl lacto-N-néo tétraose	ND	2583 ± 520

Les bactéries ( $10^6$  bactéries/ml), en suspension dans du PBS contenant différentes concentrations en glycoprotéines inhibitrices, sont incubées 1 h à 37°C avant d'être mises en contact soit avec ces mêmes glycoprotéines immobilisées<sup>a</sup>, soit avec des mucines gastriques de Porc immobilisées<sup>b</sup>. Une concentration est considérée comme inhibitrice pour une diminution de l'adhérence de plus de 20% par rapport à un témoin (bactéries + PBS).

ND : concentration inhibitrice non déterminée.

diminution significative de l'adhérence à ces mêmes mucines immobilisées sur polystyrène. Les mucines, isolées à partir de méconium, inhibent également très fortement l'adhérence bactérienne aux mucines gastriques de Porc immobilisées (5,5-9,5 µg/ml). Les structures reconnues par la bactérie au niveau des mucines gastriques se retrouveraient sur les mucines isolées du méconium.

Dans ce type d'expérimentation, on remarque que la réponse est variable en fonction de la nature de la mucine inhibitrice et de la glycoprotéine immobilisée sur plaque de microtitration. Une faible concentration de mucines intestinales de Rat (25-77 µg/ml) suffit à inhiber l'adhérence bactérienne à ces mêmes mucines immobilisées sur polystyrène, alors qu'une concentration de 1,25 mg/ml est nécessaire pour inhiber l'adhérence bactérienne aux mucines gastriques de Porc immobilisées. Les récepteurs présents sur les mucines gastriques de Porc sont donc distincts des récepteurs rencontrés sur les mucines intestinales de Rat.

*B. bifidum* possède une affinité nettement plus élevée pour les mucines gastriques de Porc ou le méconium que pour les autres types de mucines.

L'inhibition de l'adhérence est d'autant plus faible que la structure de l'inhibiteur est différente de celle de la glycoprotéine immobilisée. La glycophorine A est reconnue par *B. bifidum*, mais elle est incapable d'inhiber l'interaction entre *B. bifidum* et les mucines gastriques de Porc.

On peut expliquer le comportement différent vis-à-vis des mucines par des teneurs en saccharides très différentes : 25 à 30% pour les mucines gastriques de Porc et le méconium, entre 1 et 5% pour les autres mucines. Cependant, il n'est pas possible d'expliquer le phénomène d'adhérence uniquement par la présence de structures saccharidiques. D'autres glycoprotéines ont également été testées à des concentrations de 10 mg/ml sans entraîner d'inhibition (Lactotransferrine humaine et bovine,  $\alpha$ -1-glycoprotéine acide sérique, ovalbumine).

## 2-Inhibition de l'adhérence par des structures saccharidiques

Les oligosaccharides du lait de Femme (lacto-N-tétraose, lacto-N-néo-tétraose) ne sont pas inhibiteurs à moins d'être présents à des concentrations élevées (> 3mg/ml), incompatibles avec des teneurs physiologiques, de même les oligosaccharides complexes obtenus après  $\beta$ -élimination des mucines sont sans action sur la réaction d'adhésion.

Ces résultats tendent à montrer que les structures saccharidiques ne sont pas impliquées directement dans le mécanisme d'attachement de *B. bifidum* aux mucines.

### 3-Inhibition de l'adhérence par des mucines modifiées

Les récepteurs à la surface des mucines pouvant être soit de nature protéique, soit de nature glycanique, nous avons utilisé en test d'inhibition des mucines déglycosylées et des mucines ayant subies une hydrolyse par les protéases. Nous avons choisi de modifier les mucines gastriques de Porc et les mucines isolées du méconium, ces mucines donnant de bons résultats en inhibition d'adhérence.

L'axe protéique des mucines étant dénaturé par l'hydrolyse chimique des O-glycannes, nous avons testé les mucines après déglycosylation par les endo- et exoglycosidases de *B. bifidum* immobilisées sur Eupergit. Les mucines, après traitement, sont séparées des billes d'Eupergit. La fraction mucines, de poids moléculaire élevé, est séparée de la fraction sucre par chromatographie de gel filtration sur Sepharose 4B. Les différents sucres sont ensuite isolés par séparation sur TSK HW 40S. La déglycosylation n'est pas totale, mais elle représente une élimination d'environ 50% des sucres. Ces oses doivent se localiser à la périphérie des mucines car ils sont ainsi plus accessibles à l'attaque enzymatique. La déglycosylation partielle peut aussi s'expliquer par la persistance de structures sulfatées, *B. bifidum* ne possédant pas de sulfatases.

L'élimination de ces sucres ne modifie pas le pourcentage d'inhibition par rapport aux mucines non traitées. Afin de déterminer la part jouée par les sucres dans l'adhérence, nous avons utilisé l'oxydation périodique. Les mucines oxydées perdent 25% de leur pouvoir inhibiteur par rapport à un témoin mucine contenant de l'iodate de sodium à la même concentration.

Pour apprécier la participation des protéines dans le phénomène d'adhérence aux mucines, nous avons traité ces glycoprotéines par la pronase. Malgré un traitement drastique, nous n'avons pas réussi à hydrolyser les mucines gastriques de Porc. Nous avons donc traité les mucines isolées du méconium. Ces mucines doivent posséder de plus grandes fractions peptidiques non protégées par les oligosaccharides. Après hydrolyse par la pronase, on observe une réduction de 48 % des propriétés adhérentes par rapport aux mucines non traitées.

### Discussion

Notre but a alors été d'analyser plus finement les structures reconnues par la bactérie. Mais lorsque l'adhésion bactérienne se produit sur une glycoprotéine, il est toujours difficile d'établir si c'est la partie glycosylée ou la partie protéique qui est reconnue. De plus, les

glycoprotéines peuvent posséder plusieurs chaînes glycaniques différentes. La caractérisation du récepteur glycanique des glycoprotéines a surtout été établie de manière indirecte par des expériences d'inhibition d'adhésion par des sucres simples et complexes ou par l'action d'enzymes.

De nombreuses difficultés technologiques ont constitué un obstacle à cette étude :

-accessibilité limitée des enzymes à leur cible peptidique en raison de la densité des chaînes glycaniques;

-déglycosylation enzymatique trop partielle;

-déglycosylation chimique efficace mais agressive pour le peptide

Lorsque l'on compare les résultats d'inhibition d'adhérence aux glycoprotéines par ces mêmes glycoprotéines avec l'inhibition d'adhérence aux mucines gastriques immobilisées par les glycoprotéines testées, on remarque que les bifidobactéries possèdent une grande affinité pour les mucines gastriques. Les sites de reconnaissance présents sur ces mucines ne sont que partiellement présents sur les autres glycoprotéines. On remarque en particulier, l'exemple de la glycophorine A où la préincubation préalable des bifidobactéries avec la glycophorine A, inhibe la fixation à cette glycoprotéine immobilisée sans inhiber la fixation aux mucines immobilisées. D'après ces résultats, *B. bifidum* se fixe préférentiellement aux O-glycosylprotéines (glycoprotéines de type mucine) plutôt qu'aux N-glycosylprotéines ( $\alpha$ -1-glycoprotéines acide et ovalbumine). On peut donc penser à l'intervention de site récepteur de nature O-glycosidique dans les phénomènes d'adhérence de *B. bifidum* aux mucines.

Cette reconnaissance bactérie-mucines n'est pas inhibée par les sucres simples ou les disaccharides présents à la périphérie des mucines, ni par la présence de sucres plus complexes issus du lait de Femme ou libérés par la déglycosylation chimique ( $\beta$ -élimination) des mucines. L'élimination des sucres en position périphérique par déglycosylation enzymatique partielle de ces glycoprotéines ne provoque pas non plus la diminution de cette fixation. Par contre, l'oxydation périodique des mucines, donc la modification de la structure de tous les O-glycannes entraîne une légère chute de l'adhérence. La reconnaissance bactérie-mucines pourrait s'effectuer sur les sucres en position plus interne, c'est à dire les sucres du squelette ou les sucres intervenant au niveau de la liaison peptidique.

Les résultats obtenus en présence de mucines dégradées par la pronase font penser à l'intervention de l'axe peptidique des mucines.

L'adhérence de *B. bifidum* avec les mucines gastriques résulterait d'une reconnaissance entre les adhésines de la bactéries et les récepteurs situés au niveau de l'axe peptidique des

mucines et incluant les sucres proches. Ces résultats démontrent également l'intervention d'un mécanisme d'adhérence différent pour les deux méthodes utilisées : l'hémagglutination mettrait en jeu des structures de type tétrasaccharidique alors que la reconnaissance mucines-bifidobactéries étudiée par ELISA serait indépendante des oses.

Bien que *B. bifidum* possède des glycosidases capables de dégrader les mucines, cette hydrolyse n'est pas totale. Elle est due en fait à l'absence de sulfatase chez ce microorganisme. L'inactivation des glycosidases par la chaleur et la caractérisation d'une perte d'adhérence concomitante ne peuvent pas nous amener à considérer que les structures saccharidiques interviennent directement dans le mécanisme d'adhérence.

# **Conclusion Générale**

Le but du travail que nous nous étions fixé était de définir ou de mieux connaître le ou les mécanismes qui permettent à *B. bifidum* et par extension aux bifidobactéries de s'implanter au niveau de la muqueuse intestinale et d'y proliférer.

Nous nous sommes intéressés au problème de la fixation de *B. bifidum* à la muqueuse intestinale.

Plusieurs possibilités devaient être examinées :

1-interaction au niveau des mucines

2-interaction au niveau des cellules de la muqueuse intestinale

3-définition des structures intervenant dans l'adhérence

Les résultats que nous avons obtenus au niveau de l'interaction de *B. bifidum* avec les mucines nous permettent d'aboutir aux conclusions suivantes .

*B. bifidum* possède des adhésines spécifiques des mucines et des agglutinines spécifiques des disaccharides de base des déterminants antigéniques de groupes sanguins :  $\beta$ -D-Gal (1,3) GlcNAc et  $\beta$ -D-Gal (1,4) GlcNAc. Ces structures saccharidiques n'interviennent cependant pas directement dans l'interaction entre *B. bifidum* et les mucines (du moins par une évaluation à l'aide de la technique ELISA que nous avons mis au point). On ne peut cependant pas nier toute participation des sucres dans le mécanisme d'interaction avec les mucines. Il faut noter que *B. bifidum* possède une forte potentialité d'activités glycosidiques qui s'expriment à la périphérie externe du microorganisme et que la disparition de ces activités enzymatiques entraîne une perte de l'adhérence. Nous pouvons supposer à ce niveau que l'interaction est susceptible de se dérouler en deux temps.

La première étape serait constituée par un mécanisme de reconnaissance entre saccharides et activités glycosidiques de la bactérie. Il s'ensuivrait une réaction de dégradation par récurrence de ces structures, entraînant la fourniture de nutriments et favorisant, tel un fil conducteur, le placement de la bactérie au contact du core protéique des mucines ainsi décapées. Cette phase de dégradation pourrait aussi expliquer l'établissement du phénomène de barrière vis-à-vis des autres genres microbiens. Il s'agirait ici de la disparition des sites de reconnaissance nécessaires à l'adhérence des bactéries putréfiantes ou pathogènes.

La deuxième étape serait constituée par l'enclenchement de l'adhérence proprement dite. Cette étape mettrait en jeu des structures spécifiques qui seraient capables de reconnaître soit des séquences protéiques spécifiques au niveau des points de décapage des mucines, soit les O-glycosylprotéines protégées par la présence des structures sulfatées. On peut aussi

admettre que les structures spécifiques de *B. bifidum* sont susceptibles de réagir aussi avec l'axe peptidique non glycosylé des mucines.

Nous avons mis en évidence que l'adhérence aux mucines variait en fonction de l'âge de la bactérie. Plus une bactérie est âgée, moins elle adhère aux mucines. Cette propriété est concomitante à l'expression d'une hydrophobicité importante de la surface bactérienne. On peut imaginer que le remodelage des enveloppes bactériennes se traduit par un masquage des sites spécifiques de reconnaissance des mucines, entraînant par la même occasion un relargage du microorganisme de ses sites d'adhésion. Cette propriété permettrait d'expliquer le renouvellement de *B. bifidum* au niveau du tractus digestif.

La caractérisation d'un relargage spontané de structures spécifiques de la part de *B. bifidum* reconnaissant les mucines permet là encore d'argumenter en faveur de l'effet de barrière : ces adhésines viendraient saturer les mucines, empêchant les bactéries pathogènes ou putréfiantes de trouver leur site de fixation. On peut même envisager, dans ce cas, que *B. bifidum* ne s'attache aux mucines que le temps de leur dégradation, fournissant ainsi au milieu les structures spécifiques de saturation. Si tel était le cas, l'effet probiotique des bifidobactéries serait alors parfaitement démontré, sans qu'il y ait besoin d'implantation du microorganisme au niveau des muqueuses.

Les résultats que nous avons obtenus concernant l'interaction de *B. bifidum* aux cellules épithéliales de l'intestin nous permettent d'aboutir aux conclusions suivantes.

*B. bifidum* est susceptible d'adhérer aussi bien aux cellules HT-29 standard qu'aux cellules HT-29-MTX. L'adhérence aux cellules non mucines-secrétrices (HT-29) est supérieure à celle obtenue pour les cellules mucines-secrétrices. Dans ce cas, il peut s'agir d'artefacts de manipulation, les mucines limitant l'accès aux structures cellulaires ou les différents lavages entraînant l'élimination des mucines, diminueraient de ce fait le taux de bactéries fixées à ces dernières. Quoiqu'il en soit, les résultats permettent d'affirmer que les structures cellulaires sont reconnues par les bifidobactéries.

Nous avons mis en évidence que le milieu de culture de *B. bifidum* renfermait des structures qui augmentaient l'interaction avec les cellules épithéliales. Nous rejoignons à ce niveau les résultats obtenus par différentes équipes sur l'interaction des lactobacilles avec les cellules CaCo2 (Reid *et al.*, 1993; Bernet *et al.*, 1993).

Pour notre part, nous pensons que *B. bifidum* doit pouvoir interagir avec les cellules épithéliales de deux façons différentes, d'une part avec les mucines associées à ces cellules et d'autre part avec des structures où les mécanismes d'interaction hydrophobe sont

prépondérants. Cette hypothèse est confortée par les travaux récents de Drumm *et al.*, 1989 et Sajjan *et al.*, 1992.

La figure 31, page 113, rassemble les différents résultats que nous avons obtenus et nous permet d'envisager comment *B. bifidum* peut adhérer aux différentes structures de la muqueuse intestinale. Si nous n'avons pas mis à jour le mécanisme dans son intégralité, nous avons contribué à la meilleure compréhension de cette interaction.

Cependant, si l'on veut expliquer le rôle bénéfique que semble jouer les bifidobactéries au niveau intestinal, il sera indispensable de poursuivre cette étude en privilégiant le système d'étude homologue constitué par : bifidobactéries-mucines intestinales humaines.

Plusieurs axes sont à privilégier :

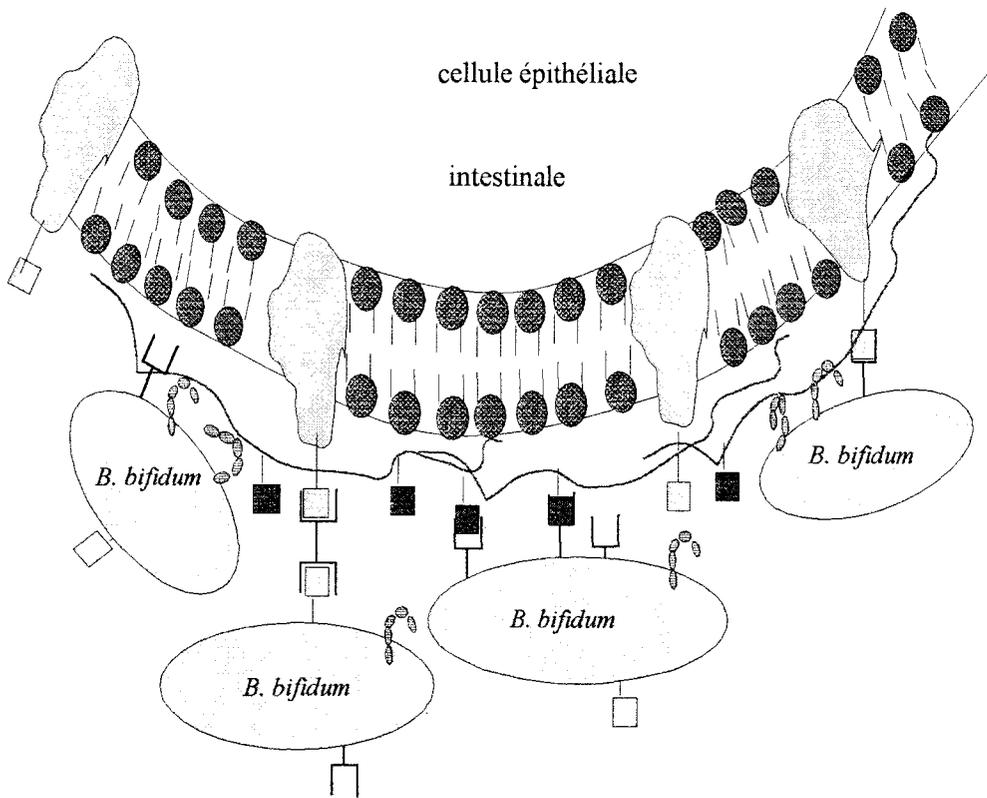
Le premier consiste à poursuivre l'étude structure-fonction des adhésines de surface exprimées par *B. bifidum*. La possibilité de cultiver la bactérie en fermenteur de grande capacité doit résoudre les problèmes d'approvisionnement de ces molécules. L'établissement de leur structure devrait nous donner des indications sur leurs molécules-cibles. Il serait aussi nécessaire d'étendre cette étude à différentes souches de bifidobactéries de façon à vérifier leur spécificité temporelle (variation des espèces en fonction de l'âge de l'hôte) ou leur spécificité d'origine (humaine, animale).

Le deuxième axe consiste à aborder l'étude des récepteurs au niveau des cellules épithéliales : quelles sont les structures qui réagissent avec les bactéries, sont-elles spécifiques ou non. En d'autres termes, les bifidobactéries sont-elles susceptibles de coloniser d'autres systèmes cellulaires? La modification des espèces de bifidobactéries, au moment du sevrage, est-elle due à une modification de la structure intestinale (maturation de l'intestin), donc des signaux de reconnaissance plutôt qu'à une modification de régime alimentaire?

Le troisième axe consiste à étudier l'interaction du système bactérien avec la cellule épithéliale. A ce stade, il sera indispensable d'isoler, de purifier et d'étudier la structure du système moléculaire qui sert d'intermédiaire dans la réaction d'attachement. Cette entité est-elle l'apanage des bifidobactéries ou de toute bactérie susceptible d'avoir un rôle de probiotique?

La réponse à ces questions permettra de démontrer et d'expliquer plus scientifiquement le rôle bénéfique joué par les bifidobactéries au niveau du tractus digestif. Il sera alors possible d'envisager une véritable industrie des laits fermentés aux bifidobactéries, dans le but de

protéger la muqueuse intestinale vis-à-vis des bactéries pathogènes ou putréfiantes, ou encore de certains virus; l'industrie alimentaire rejoignant ainsi l'industrie pharmaceutique.



**Figure 31 : Modèle du mécanisme d'adhérence de *B. bifidum* à la muqueuse intestinale**

 molécules hydrophobes, 
  phospholipides, 
  ligands membranaires des cellules épithéliales, 
  ligands des mucines, 
  récepteurs, 
  ligands de la surface bactérienne, 
  intermédiaire d'adhérence

# **Bibliographie**

- ALLEN, A., 1983, Mucus -a protective secretion of complexity. Trends Biochem. Sci., 8, 169-173
- APPOURCHAUX, L., 1989, Purification et Propriétés des b-D-galactosidases et des N-acétyl-b-D-glucosaminidases de *Bifidobacterium bifidum* souche AA 2/2. Thèse Université Lille, France
- ARP, L.H., 1988, Bacterial infection of mucosal surfaces : an overview of cellular and molecular mechanisms. In "Virulence mechanisms of bacterial pathogens". J.A. Roth ed., American Society of Microbiology, Washington, D.C., pp 3-27
- ASSELIN, D., 1988, Effets de l'ingestion de laits fermentés au *Bifidobacterium longum* sur la flore intestinale humaine. Thèse Université Caen, France
- BAHAKA, D., NEUT, C., KHATTABI, A., MONGUET, D. and GAVINI, F., 1993, Phenotypic and genomic analysis of human strains belonging or related to *Bifidobacterium longum*, *B. infantis* and *B. Breve*. Int. J. Syst. Bacteriol., 43, 565-573
- BALLONGUE, J., GRILL, J-P. et BARATTE-EULOGE, P., 1993, Action sur la flore intestinale de laits fermentés au *Bifidobacterium*. Lait, 73, 249-256
- BENNO, Y., SAWADA, K. and MITSUOKA, T., 1984, The intestinal microflora of infants : composition of fecal flora in breast-fed and bottle-fed infants. Microbiol. Immun., 28, 975-986
- BENNO, Y., SAWADA, K. and MITSUOKA, T., 1985, The intestinal microflora of infants : fecal flora of infants with vitamin K deficiency. Microbiol. Immun., 29 (3), 243-250
- BENNO, Y. and MITSUOKA, T., 1992, Impact of *Bifidobacterium longum* on human fecal microflora. Microbiol. Immunol., 36, 683-694
- BERNET, M.-F., BRASSART, D., NEESER, J.-R. and SERVIN, A.L., 1993, Adhesion of Human Bifidobacterial Strains to Cultured Human Intestinal Epithelial Cells and Inhibition of Enteropathogen-Cell Interactions. Appl. Environ. Microbiol., 159, 4121-4128
- BERNIER, J-J., ADRIAN, J. et VIDON N., 1988, Les aliments du tube digestif. Doin Editeur, Paris, pp 468
- BERRADA, N., LEMELAND, J.F., LAROCHE, G., THOUVENOT, P. and PIAIA, M., 1991, *Bifidobacterium* from fermented milks : survival during gastric transit. J. Dairy Sci., 74, 409-413
- BEZIRTZOGLU, E., 1985, Contribution à l'étude de l'implantation de la flore fécale anaérobie du nouveau-né mis au monde par césarienne. Thèse Université Paris sud, France
- BEZKOROVAINY, A. and TOPOUZIAN, N., 1983, Aspects of iron metabolism in *B. bifidum* var. *Penn*. Int. J. Biochem., 15 (3), 361-366

- **BEZKOROVAINY, A., TOPOUZIAN, N. and MILLER-CATCHPOLE, R.**, 1986, Mechanisms of ferric and ferrous iron uptake by *Bifidobacterium bifidum* var. *Pennsylvanicus*. Clin. Physiol. Biochem., 4, 150-158
- **BHATTACHARYA, P.R. and MAJUNDER, M.K.**, 1983, Survival of orally administered isolated intestinal *Lactobacillus acidophilus* in different parts of gastrointestinal tract of mice. J. Biosci., 5, 97-105
- **BIAVATI, B., CASTAGNOLI, P., CROCIANI, P. and TROVATELLI, L.D.**, 1984, Species of *Bifidobacterium* in the feces of infants. Microbiol., 7, 341-345
- **BOCK, K., BREIMER, M.E., BRIGNOLE, A., HANSSON, G.C., KARLSSON, K-A., LARSON, G., LEFFLER, H., SAMUELSSON, B.E., STROMBERG, N., SVANBORG EDEN, C. and THURIN J.**, 1985, Specificity of binding of a strain of uropathogenic *Escherichia coli* to Gal $\alpha$ 1-4Gal containing glycosphingolipids. J. Biol. Chem., 260, 8545-8551.
- **BOREN, T., FALK, P., ROTH, K.A., LARSON, G. and NORMARK, S.**, 1993, Attachment of *Helicobacter pylori* to Human Gastric Epithelium Mediated by Blood Group Antigens. Science, 262, 1892-1895
- **BOUHNİK, Y., POCHARD, P., MARTEAU, P., ARLET, G. GODEREL, L. and RAMBAUD, J-C.**, 1992, Faecal recovery in humans of viable *Bifidobacterium* sp. ingested in fermented milk. Gastroenterology, 102, 875-878
- **BOUHNİK, Y.**, 1993, Survie et effets chez l'homme des bactéries ingérées dans les laits fermentés. Lait, 73, 241-247
- **BOURNE, K.A., BEEBE, J.L., LUE, Y.A. and ELLNER, P.D.**, 1978, Bacteremia due to *Bifidobacterium*, *Eubacterium* or *Lactobacillus*; twenty one cases and review of the literature. Yale J. Biol. Med., 51, 505-512
- **BOUTRY, E.**, 1989, Exoglycosidases de *Bifidobacterium bifidum* souche AA 2/2. Thèse Université Lille, France
- **BOTTAZZI, V.**, 1990, Activité probiotique et thérapeutique des bactéries lactiques et des bifidobactéries. In "*Bifidobacterium* et Facteurs bifidigènes". ARBA, ID2 Communication, Nancy, pp 9-31
- **BUCHANAN, R.E. and GIBBONS, N.E.**, 1974, In "Bergey's manual of determinative bacteriology", 8<sup>th</sup> ed WILLIAMS et WILKENS Co., Baltimore, USA
- **BULLEN, C.L., TEARLE, P.V. and STEWART, M.G.**, 1977, The effect of "humanised" milks and supplemented breast-feeding on the faecal flora of infants. J. Med. Microbiol., 10, 403-413

- **CARLSON, D.M.**, 1977, In "Mucus in Health and Disease" (Elstein M. And Parke D.V., eds), Plenum Press, New York, pp 251-273
- **CARLSTEDT, I., SHEEHAN, J.K., CORFIELD, A.P. and GALLAGHER, J.T.**, 1985, Mucus glycoproteins : a gel of a problem. *Essays in biochemistry*, **20**, 40-76
- **CERI, H. and WESTRA, Y.**, 1988, Host binding proteins and bacterial adhesion : ecology and binding model. *Biochem. Cell Biol.*, **66**, 541-548
- **CODINGTON, J.F., COOPER, A.G., BROWN, M.G. and JEANLOZ, R.W.**, 1975, Evidence that the major cell surface glycoprotein of the TA3-HA carcinoma contains the *Vicia graminea* receptor sites. *Biochem.*, **14**, 855-859
- **COLE, C.B. and FULLER, R.**, 1984, A note on the effect of host specific fermented milk on the coliform population of the neonatal rat gut. *J. Appl. Bacteriol.*, **56**, 495-498
- **COLLINS, F.M. and CARTER, P.B.**, 1978, Growth of salmonellae in orally infected germfree mice. *Infect. Immun.*, **21**, 41-47
- **COLOMBEL, J.F., CORTOT, A., NEUT, C. and ROMOND, C.**, 1987, Yoghurt with *Bifidobacterium longum* reduces erythromycin-induced gastrointestinal effects. *Lancet*, **ii** : 43
- **CONWAY, P.L., GORBACH, S.H. and GOLDIN, B.R.**, 1987, Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J. Dairy Sci.*, **70**, 1-12
- **COSTERTON, J.W., IRVIN, R.T. and CHENG, K-J.**, 1981, The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Ann. Rev. Microbiol.*, **35**, 299-324
- **CUMMINS, C.S., GLENDENNING, O.M. and HARRIS, H.**, 1957, Composition of the cell wall of *Lactobacillus bifidus*. *Nature*, **180**, 337-338
- **DEGAND, P., ROUSSEL, P., LAMBLIN, G. and HAVEZ, R.**, 1973, Purification and study of bronchogenic cysts mucins. *Biochim. Biophys. Acta*, **320**, 318-330
- **DEGUSHI, Y., MORISHITA, T. and MUTAI, M.**, 1985, Comparative studies in synthesis of water soluble vitamins among human species of Bifidobacteria. *Agr. Biol. Chem.*, **49** (1), 13-19
- **DE SIMONE, C., CLARDI, A., GRASSI, A., LAMBERT GARDINI, S., TZANTZOGLOU, S., TRINCHIERI, V., MORETTI, S. and JIRILLO, E.**, 1992, Effect of *Bifidobacterium bifidum* and *Bacillus acidophilus* on gut mucosa and peripheral blood B lymphocytes. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, **14**, 331-340
- **DE VAULT, J.D., BERRY, A., MISRA, T.K., DARZINS, A. and CHAKRABARTY, A.M.**, 1989, Environmental sensory signals and microbial pathogenesis : *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *Biol. Technology*, **7**, 352-357

- **DE VRIES, W., GERBRANDY, S.J. and STOUTHAMER, A.H.**, 1967, Carbohydrate metabolism in *Bifidobacterium bifidum*. *Biochem. Biophys. Acta*, **136**, 415-425
- **DE VRIES, W. and STOUTHAMER, A.H.**, 1969, Factors determining the degree of anaerobiosis of *Bifidobacterium* strains. *Arch. Microbiol.*, **65** (3), 275-287
- **DOMENICO, P., DIEDRICH, D.L. and CUNHA B.A.**, 1989, Quantitative extraction and purification of exopolysaccharides from *Klebsiella pneumoniae*. *J. Microbiol. Meth.*, **9**, 211-219
- **DRON, D.**, 1992, Les glycosidases de *Bifidobacterium bifidum* : caractérisation d'une galactophosphorylase et d'endoglycosidases en relation avec la dégradation des mucines. DEA Université Lille, France
- **DRUMM, B., NEUMANN, A.W., POLICOVA, Z., and SHERMAN, P.M.**, 1989, Bacterial cell surface hydrophobicity properties in the mediation of in vitro adhesion by the rabbit enteric pathogen *Escherichia coli* strain RDEC-1. *J. Clin. Invest.* **84**, 1588-1594
- **DUCLUZEAU, R. et RAIBAUD, P.**, 1979, Ecologie microbienne du tube digestif. Masson Editeur, Paris, pp 94
- **EBISSAWA, E., ASSARI, T., TAKEDA, S., WATANABE, A., NIHEI, K., TAMASHI, T., WAKIGUCHI, H. et WATANABE, S.**, 1987, Utilisation de lait fermenté additionné de bifidus actif chez la femme enceinte. 1<sup>er</sup> colloque "*Bifidobacterium longum* et Santé", Monte Carlo Méd. Chir. Dig., **16** (3), 9-11
- **EDENS, F., CASAS, I. and DOBROGOSZ, W.**, 1991, In ovo, spray, and feed-supplement methods for delivering *Lactobacillus reuteri* (a direct fed microbial) to turkey embryos and newly hatched poults. In "Proceedings of the European Symposium on Lactic Acid Bacteria", Caen, Normandy, France, 12-13 september, 1991.
- **ENGVALL, E. and PERMANN, P.**, 1971, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), quantitative assay of IgG. *Immunochemistry*, **8**, 871-874
- **FERMANDES, C.F., SHAHANI K.M. and AMER, M.A.**, 1987, Therapeutic role of dietary lactobacilli and lactobacillic fermented dairy products. *FEMS Microbiol. Rev.*, **46**, 343-349
- **FINKELSTEIN, R.A., SCIOETINO, C. and MAC INTOSCH, M.A.**, 1983, Role of iron in microbe-host interactions. *Rev. Infect. Dis. J.*, **5** (sup.4), S 759-77
- **FITZ-JAMES, P.C.**, 1960, Participation of the cytoplasmique membrane in the growth and spore formation of *bacilli*. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **8**, 507
- **FULLER, R.**, 1975, Nature of the determinant responsible for the adhesion of *lactobacilli* to chicken crop epithelial cells. *J. Gen. Microbiol.*, **87**, 245-250

- **GALLAGHER, J.T. and CORFIELD, A.P.**, 1978, Mucus type glycoproteins. Trends Biochem. Sci., 3, 38-41
- **GAUHE, A., GYORGY, P., HOOVER, J.R.E., KUHN, R., ROSE, C.S., RUELIUS, H.W. and ZILLIKEN, F.**, 1954, Bifidus factor IV : preparations obtained from human milk. Arch. Biochem. Biophys., 48, 214-224.
- **GAVINI, F., POURCHER, A.M., NEUT, C., MONGET, D., OGER, C. and IZARD, D.**, 1991, Phenotypic differentiation of Bifidobacteria of human and animal origins. Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 548-557.
- **GLICK, M.C., SALL, T., ZILLIKEN, F. and MUDD, D.**, 1960, Morphological changes of *L. Bifidus* var. *Penn* produced by cell-wall precursor. Biochem. Biophys. Acta, 37 (2), 363-365
- **GORBACH, S.L., CHANS, T-W. and GOLDIN, B.**, 1987, Successful treatment of relapsing *Clostridium difficile* colitis with *Lactobacillus GG*. Lancet, ii : 1519
- **GORBACH, S.L., BARZA, M., GIULIANO, M. and JACOBUS, N.V.**, 1988, Colonisation resistance of the human intestinal microflora: testing the hypothesis in normal volunteers. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 7, 98-102
- **GREENAWALT, J.W. and WHITESIDE, T.**, 1976, Mesosomes : membranous bacterial organells. Bacteriol. Rev., 39, 405
- **GRIMAUD, J-C., BOUVIER, M., BERTOLINO, J-G., SALDUCCI, J., CHIARELLI, P. and BOULEY, C.**, 1992, Effects of milk fermented by *Bifidobacterium* on colonic transit time. Hellenic J. Gastroenterol., 5, 104
- **GRIMMONPREZ, L. et MONTREUIL, J.**, 1968, Etude physicochimique de 6 nouveaux oligosides isolés du lait de Femme. Bull. Soc. Chim. Biol., 50, 843-848
- **GUINET, R.M.F., ROGEMOND, V., TESSIER, F. and CAPDEPUY, M.**, 1986, Characterization and possible role of lectin-like adhesin in the *Bacteroides fragilis* group. In "Biology of anaerobic bacteria". Ed. by Dubourguier, H.C. et al. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, pp 60-68
- **GYORGY, P., KUHN, R., ROSE, C.S. and ZILLIKEN, F.**, 1954, Bifidus factor II : its occurrence in milk from different species and in other natural products. Arch. Biochem. Biophys., 48, 202-208
- **GYORGY, P. and ROSE, C.S.**, 1955a, Microbiological studies on growth factor for *L. Bifidus* var. *Pennsylvanicus*. Proc. Soc. Exp. Biol., 90, 219-223
- **GYORGY, P. and ROSE, C.S.**, 1955b, Further observations on metabolic requirement of *Lactobacillus bifidus* var. *Pennsylvanicus*., J. Bacteriol., 69, 483

- **HABU, Y., HAGAOKA, M., YOKOKURA, T. and HAZIMA, I.**, 1987, Structural studies of cell wall polysaccharides from *Bifidobacterium bifidum* breve YIT 4010 and related *Bifidobacterium* species. *J. Biochem.*, **102**, 1423-1432
- **HAMZE, M.**, 1984, Contribution à la production de facteurs bifidigènes et à leur étude *in vitro* et *in vivo*. Thèse Universitaire Lille, France
- **HASSINEN, J.B., DURBIN, G.T., TOMARELLI, R.M. and BERNHART, F.W.**, 1951, The minimal nutritional requirements of *Lactobacillus bifidus*, *J. Bacteriol.*, **62**, 771-777
- **HAWSWORTH, G., DRASAR, B.S. and HILL, M.J.**, 1971, Intestinal bacteria and the hydrolysis of glycosidic bonds. *J. Med. Microbiol.*, **4**, 451-459.
- **HENTGES, D.J.**, 1983, Role of the intestinal microflora in host defense against infection. *In* "Human intestinal microflora in health and disease". Chap. 14, Eds. DJ Hentges. Academic Press, New York. pp 311-331
- **HIGGINS, M.L., PARKS, L.C. and DANEOMOORE, L.**, 1981, The mesosome. *In* "Organization of Prokaryotic Cell Membranes". Vol.2, Ghosh, B. K., Ed., CRC Press, Boca Raton, FL.
- **HIRANO, S., HAYASHI, H., TIRABAYASHI, T., ONODERA, K., ISEKI, S., KOCHIBE, N., NAGAI, Y., NAKASAKI, T. and IMAGAWA, T.**, 1968, Biologically active glycopeptides in human colostrum. *J. Biochem.*, **64**, 563-565
- **HOFFMAN, K., MOSSEL, D.A.A., KORUS, W. and VAN DE KAMER, J.H.**, 1964, Mode of action of lactulose in the intestine. *Klin. Wschr.*, **42**, 126-130
- **HOMMA, N. and KOHNO, M.**, 1960, Effect of the metabolites of *Escherichia coli* on the growth of *L. bifidus*. *Shonika kinsho*, **13**, 1272-1274.
- **HOTTA, M., SATO, Y., IWATA, S., YAMASHITA, N., SUNAKAWA, K., OIKAWA, T., TANAKA, R., WATANABE, K., TAKAYAMA, H., YAJIMA, M., SKIGUCHI, S., ARAI, S., SAKURAI, T. and MUTAI, M.**, 1987, Clinical effects of *Bifidobacterium* preparations on pediatric intractable diarrhea. *Keio. J. Med.*, **36**, 298-314
- **HOUNSELL, E.F. and FEIZI, T.**, 1982, Gastrointestinal mucins. Structures and antigenicities of their carbohydrate chains in health and disease. *Med. Biol.*, **60**, 227-236
- **HUSAIN, I., POUPARD, J.A., and NORRIS, R.F.**, 1972, Influence of nutrition on the morphology of a strain of *Bifidobacterium bifidum*. *J. Bacteriol.* , **111**, 841
- **ISAACSON, R.E.**, 1983, Regulation of expression of *Escherichia coli* pilus K99. *Infect. Immun.*, **40**, 633-639

- **JONES, G.W. and RUTTER, J.M.**, 1974, The association of K88 antigen with haemagglutination activity in porcine strains of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.*, **84**, 135-144
- **KADA-ODA Y., FUJIWARA, S. and HIROTA, T.**, 1991, Effects of bifidobacteria cells on mitogenic response of splenocytes and several functions of phagocytes. *Milchwissenschaft*, **46**, 626-630.
- **KAMERLING, J.P., GERWING, G.J., Vliegenthart, J.F.G. and CLAMP, J.R.**, 1975, Characterization by gas liquid chromatography mass spectrometry of pertrimethylsilyl glycosides obtained in the methanolysis of glycoproteins and glycolipids. *Biochem. J.*, **151**, 491-495
- **KANDLER, O., KOCH, D. and SCHLEFER, K.H.**, 1968, Amino acid sequence of glycine containing murein of some strains of *L. Bifidus*. *Arch. Mikrobiol.*, **61** (1), 181-186
- **KANDLER, O.**, 1970, Amino acid sequence of the murein and taxonomy of the genera *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc* and *Pedicoccus*. *Int. J. Syst. Bact.*, **20**, 491-508
- **KANDLER, O. and LAUER, E.**, 1974, Modern concepts of taxonomy of Bifidobacteria. *Zbt. Bakt.*, **228**, 29-45
- **KATSUJI, O., MICHIO, O. and TETSUO, K.**, 1989, Neuraminidase enhanced attachment *Bacteroides intermedius* to human erythrocytes and buccal epithelial cells. *Infect. Immun.*, **57**, 1635-1637
- **KEHAGIAS, C., JAO, Y.C., MIKOLAJCIK, E.M. and HANSEN, P.M.T.**, 1977, Growth response of *B. bifidum* to a hydrolytic product isolated from bovin casein. *J. Food Sci.*, **42**, 146-160
- **KEUSCH, G.T., JACEWICZ, M. and DONOHUE-ROLFE, A.**, 1986, Pathogenesis of Shigella Diarrhea : Evidence for an N-Linked Glycoprotein Shigella Toxin Receptor and Receptor Modulation by b-Galactosidase. *J. Infect. Dis.*, **153**, 238-248
- **KLING, C.A.**, 1914, Du role physiologique joué par le "Bacillus Bifidus" dans le canal intestinal. *Ann. Ins. Pasteur*, **28**, 797-806.
- **KHUN, R., BAER, H.H.**, 1956, Die Konstitution der Lacto-N-Tetraose. *Chem. Ber.*, **89**, 504
- **KHUN, R.**, 1958, Les oligosaccharides du lait., *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **40**, 297-314.
- **KHUN, R.**, 1959, *In* "Carbohydrate chemistry of substances of biological interest", vol.1, ed WOLFORM, M.L., Pergamon press, pp 67

- **KOJIMA, M., SUDA, S., HOTTA, S. and HAMADA, K.**, 1968, Induction of pleomorphism in *Lactobacillus bifidus*. J. Bacteriol., **95**, 710-711
- **KOJIMA, M., SUDA, S., HOTTA, S. and HAMADA, K.**, 1970, Induction of pleomorphology and calcium ion deficiency in *Lactobacillus bifidus*. J. Bacteriol., **102**, 217-220
- **KRIVAN, H.C., GINSBURG, V. and ROBERTS, D.D.**, 1987, *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas cepacia* isolated from cystic fibrosis patients bind specifically to gangliotetraosylceramide (asialo GM1) and gangliotriaosylceramide (asialo GM2). Arch. Biochem. Biophys., **260**, 493-496
- **KUROMIYA, R.**, 1960, The study of the effect of underlike substances especially carrot powder in dispeptic infants., Ochamomizu Igaku Zasshi, **8**, 88-102
- **LAEMMLI, U.K.**, 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. Nature (Lond.), **227**, 680-685
- **LAMONT, J.T. and VENTOLA, A.S.**, 1980, Purification and composition of colonic epithelial mucin. Biochem. Biophys. Acta, **626**, 234-243
- **LOPES, J.D., REIS, M.D., and BRENTANI, R.R.**, 1985, Presence of laminin receptors in *Staphylococcus aureus*. Science, **229**, 275-277
- **LUGOVSKAIA, R.K. and LADODO, K.S.**, 1984, Comparative evaluation of intestinal microflora in infants on artificial feeding with various milk formulas. Vopr. Pitan., **4**, 29-33.
- **MANCIAUX, M.**, 1958, *Bifidobacterium bifidum* : ses facteurs de croissance. Essais d'implantation chez le nourrisson. Thèse Université Nancy, France.
- **MANTLE, M. and HUSAR, S.C.**, 1993, Adhesion of *Yersinia enterocolitis* to Purified rabbit and human intestinal mucine. Infect. Immun., **61**, 2340-2346
- **MARTEAU, P., POCHARD, P., FLOURIE, P., PELLIER, P., SANTOS, L., DESJEUX, J-F. and RAMBAUD J-C.**, 1990, Effect of chronic ingestion of a fermented dairy product containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* on metabolic activities of the colonic flora in human. Am. J. Clin. Nutr., **52**, 685-688
- **MARTEAU, P., POCHARD, P., BOUHNİK, Y., ZIDI, S., GODEREL, I. et RAMBAUD, J-C.**, 1992, Survie dans l'intestin grêle de *Lactobacillus acidophilus* et *Bifidobacterium* sp. ingérés dans un lait fermenté. Gastroenterol. Clin. Biol., **16**, 25-28
- **MATTARELLI, P., BIAVATI, B., CROCIANI, F., SCARDOVI, V. and PRATI, G.**, 1993, Bifidobacterial cell wall proteins (BIFOP) in *Bifidobacterium globosum*. Res. Microbiol., **144**, 581-590

- **MATTEUZZI, D., CROCIANI, F. and ENALDI, O.**, 1978, Amino acids produced by Bifidobacteria and some Clostridia., *Ann. Microbiol.*, **129** (2), 175-182
- **METCHNIKOFF, E.**, 1907, The prolongation of life. Optimistic studies. Heinemann, London
- **MINAGAWA, K. and OKADA, T.**, 1974, An investigation on the possibility of lysozyme production by *Lactobacillus bifidus*. *Bull. Josai Dent. Univ.*, **3**, 233-237
- **MITSUOKA, T. and HAYAKAWA, K.**, 1972, Die Faekalflora bei Menschen : I. Mitteilung : Die Zusammensetzung der Faekalflora der verschiedenen Altersgruppen. *Zentralbl. Bakteriolk. Hyg. I. Abt. Orig.*, **A223**, 333-342
- **MITSUOKA, T.**, 1974, Studies on intestinal flora. *Jap. J. Bact.*, **29** (6), 773-788
- **MITSUOKA, T. and KANEUCHI, C.**, 1977, Ecology of the bifidobacteria. *Am. J. Clin. Nutr.*, **30**, 1799-1810
- **MITSUOKA, T.**, 1982, Recents trends in research on intestinal flora. *Bifidobacteria Microflora*, **1**, 3-24
- **MITSUOKA, T.**, 1984, Taxonomy and ecology of bifidobacteria. *Bifidobacteria Microflora*, **3**, 11-28
- **MITSUOKA, T.**, 1990, Bifidobacteria and their role in human health. *J. Ind. Microbiol.*, **6**, 263-268.
- **MODLER, H.W., MCKELLAR, R.C. and YAGUCHI, M.**, 1990, Bifidobacteria and bifidogenic factors. *Can. Inst. Food Sir. Technol.*, **23**, 29-41
- **MONTREUIL, J.**, 1956, Structure d'un tetraholoside isolé du lait de femme. *C. R. Acad. Sci.*, **242**, 828
- **MONTREUIL, J., BOUQUELET, S., DEBRAY, H., LEMOINE, J., MICHALSKI, J-C., SPIK, G. AND STRECKER, G.**, 1994, Glycoproteins. *In "Carbohydrate Analysis"*, Ed. CHAPLIN, M.,F. and KENNEDY, J.F, IRL Press Oxford, Chapter 5, pp 181-293
- **MOREAU, M.C., THOMASSON, M., DUCLUZEAU, R. et RAIBAUD, P.**, 1986, Cinétique d'établissement de la microflore digestive chez le nouveau-né humain en fonction de la nature du lait. *Reprod. Nutr. Develop.*, **26** (2B), 745-753
- **MORO, E.**, 1907, Weitere Untersuchungen betreffend die endogene Infektion des Säuglingsdarmes. *Mschr. Kinderheilk*, **6**, 550-563
- **NEIMANN, N., DE LAVERGNE, E.V., PIERSON, M. et MANCIAUX, M.**, 1959, Le bifidus et ses facteurs de croissance. *Pediatric*, **14**, 837
- **NEUT, C., ROMOND, C. et BEERENS, H.**, 1981, Identification des *Bifidobacterium* en fonction de leurs besoins nutritionnels. *Rev. Inst. Pasteur Lyon*, **14**, 19-26

- NEUT, C., LESIEUR, V., BEERENS, H. and ROMOND, C., 1985, Changes in the composition of faecal flora during weaning. *Microecology Therapy*, **15**, 303
- NICHOLS, I.H., BEZKOROVAINY, A. and LANDU, W., 1974, Human colostrum whey M-1 glycoproteins and their *L. bifidus* var. *Penn.* growth promoting activities. *Life Sci.*, **14**, 967-976
- NORRIS, R.F., FLANDERS, T., TOMARELLI, R.M. and GYORGY, P., 1950, The isolation and cultivation of *Lactobacillus bifidus* : a comparison of branched and unbranched strains. *J. Bacteriol.*, **60**, 681-696
- OHTA, K., HOMMA, T., KOYAMA, T., ICHIHASHI, Y., NIKI, T., URANO, T., SAKASHITA, A. and OHSIMA, Y., 1971, Effect of pantethine on growth of Bifidobacteria in the intestines of bottle-fed infants. *Acta Paed. Jpn.*, **75**, 1003-1016
- OP DEN CAMP, H.J.M., VEERKAMP, J.H., OOSTERHOF, A. and VON HALBEEK, H., 1984, Structure of the lipoteichoic acids from *Bifidobacterium bifidum* ssp. *pennsylvanicum*. *Biochim. Biophys. Acta*, **795**, 301-313.
- OP DEN CAMP, H.J.M., OOSTERHOF, A. and VEERKAMP, J.H., 1985a, Interaction of Bifidobacterial Lipoteichoic Acid with Human Intestinal Epithelial Cells. *Infect. Immun.*, **47**, 332-334
- OP DEN CAMP, H.J.M., OOSTERHOF, A. and VEERKAMP, J.H., 1985b, Cell surface hydrophobicity of *Bifidobacterium bifidum* subsp. *Pennsylvanicum*. *Antonie van Leeuwenhoek, J. Microbiol. Serol.*, **51**, 303
- PAZUR, J.H., 1994, Glycoproteins. In "Carbohydrate Analysis", Ed. CHAPLIN, M.F. and KENNEDY, J.F, IRL Press Oxford, Chapter3, pp 73-124
- PETSCHOW, B.W. and TALBOTT, R.D., 1991, Response of *Bifidobacterium* species to growth promoters in human and cow milk. *Pediatric. Res.*, **29**, 208-213.
- PETUELY, F., 1957, Bifidus Flora bei flaschen Kindern durch bifidogene Substanzen (Bifidus faktor). *Z. Kinderheilk.*, **79**, 174-179
- POCHART, P., MARTEAU, P., BOUHNİK, Y., GODEREL, I., BOURLIOUX, P. and RAMBAUD, J.C., 1992, Survival of bifidobacteria ingested via fermented milk during their passage through the human small intestine : an *in vivo* study using intestinal perfusion. *Am. J. Clin. Nutr.*, **55**, 78-80
- PODOLSKY, D.K. and ISSELBACHER, K., 1983, Composition of human colonic mucin. *J. Clin. Invest.*, **72**, 142-153
- POLONOWSKI, M. et LESPAGNOL, A., 1930, Un nouveau constituant du lait de Femme : le gynolactose. *C. R. Soc. Biol.*, **104**, 553-555

- **POUPARD, J.A., HUSAIN, I. and NORRIS, R.F.**, 1973, Biology of Bifidobacteria. *Bact. Rev.*, **37**, 136-165
- **RAMPHAL, R., HOUDRET, N., KOO, L., LAMBLIN, G. and ROUSSEL, P.**, 1989, Differences in adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to mucus glycopeptides from sputa of patients with cystic fibrosis and chronic bronchitis. *Infect. Immun.*, **57**, 3066-3071.
- **RASIC, J.L. and KURMANN, J.A.**, 1983, Bifidobacteria and their role. Microbiological, nutritional, physiological, medical and technological aspects and bibliography. *In* "Fermented fresh milk products and their culture", Vol. 2, Ed Birkhauser, Basel, Boston, Stuttgart.
- **RAVDIN, J.I., JOHN, J.E., JOHNSTON, L.I., INNES, D.J. and GUERRANT, R.L.**, 1985, Adherence of *Entamoeba histolytica* trophozoites to rat and human colonic mucosa. *Infect. Immun.*, **65**, 588-603
- **RAYNAUD, M.**, 1959, Le facteur bifidus 2. *Ann. Paed.*, **35**, 8-23
- **RAYNAUD, M. et BIZZINI, B.**, 1971, Purification et propriétés du facteur bifidus 2. *Ann. Nutrit. Aliment.*, **25**, 209-223
- **REID, G., SERVIN, A.L., BRUCE, A.W. and BUSSCHER, H.J.**, 1993, Adhesion of three *Lactobacillus* strains to human urinary and intestinal epithelial cells. *Microbiol.*, **75**, 57-65
- **RIMINGTON, C.**, 1940, Seromuroid and the bound carbohydrate of the sum proteins. *Biochem. J.*, **34**, 931-940
- **ROBINSON, M.**, 1951, Infant morbidity and mortality : a study of 3266 infants. *The lancet*, April, 788-794.
- **ROMOND, A.F.**, 1988, Apport d'un lait fermenté à *bifidobacterium* dans le traitement des diarrhées. Thèse Université Lille, France.
- **RONSON, C.W., TRACY NIXON, B. and AUSUBEL, F.M.**, 1987, Conserved domains in bacterial regulatory proteins that respond to environmental stimuli. *Cell*, **49**, 579-581
- **ROSE, C. S. and GYORGY, P.**, 1963, Bifidus factor 2 for growth of *Lactobacillus bifidus*. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, **112**, 923-926
- **SAJJAN, S.U., REISMAN, J., DOIG, P., IRVIN, R.T. and FORSTNER, J.F.**, 1992, Binding of nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* to normal human intestinal mucin and respiratory mucin from patient with cystic fibrosis, *J. Clin. Invest.*, **89**, 657-665.
- **SAMONA, A. and ROBINSON, R.K.**, 1991, Enumeration of bifidobacteria in dairy products. *J. Soc. Dairy Technol.*, **44**, 64-66
- **SATO, J., MOCHIZUKI, K. and HOMMA, N.**, 1982, Affinity of the *Bifidobacterium* to Intestinal Mucosal Epithelial Cells. *Bifidobacteria Microflora*, **1**, 51-54

- **SCARDOVI, V. and TROVATELLI, L.D.**, 1965, The fructose-6-phosphate shunt as a peculiar pattern of hexaose degradation in the genus *Bifidobacterium*. *Ann. Microbiol. Enzymol.*, **15**, 19-29
- **SCARDOVI, V. and TROVATELLI, L.D.**, 1969, New species of bifid bacteria from *apis mellifica* L. and *apis indica* F. A contribution to the taxonomy and biochemistry of the genus *Bifidobacterium*. *Zbl. Bakt.*, **123**, 64-88
- **SCARDOVI, V., SGORBATI, B. and ZANI, G.**, 1971, Starch gel electrophoresis of fructose-6-phosphate phosphoketolase in the genus *Bifidobacterium*. *J. Bacteriol.*, **106**, 1036-1039
- **SCARDOVI, V. and TROVATELLI, L.D.**, 1974, *Bifidobacterium animalis* comb. Nov. And the "minimum" and "subtile" groups of new Bifidobacteria found in sewage. *Int. J. Syst. Bact.*, **24**, 21-28
- **SCARDOVI, V., CASOLICCHIO, F. and VINCENZI, N.**, 1979, Multiple electrophoretic form of transaldolase and 6-phosphogluconic dehydrogenase and their relationships to the taxonomic and ecology of the bifidobacteria. *Int. J. Syst. Bact.*, **29** (4), 312-327
- **SCARDOVI, V.**, 1984, The genus *Bifidobacterium*. In "The prokariotes", Chapitre 19, pp 1951-1960
- **SCARDOVI, V.**, 1986, Genus *Bifidobacterium*. In "Bergey's manual of Systematic bacteriology", Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., and Holt, J.G., Eds., Williams & Wilkins, Baltimore, Vol. 2, 1418
- **SCHÄLI, C. and FANESTIL, D.D.**, 1985, Solubilization and reconstitution of renal phosphate transporter. *Biochim. Biophys. Acta*, **819**, 66-74
- **SCHLEIFER, K.H. and KANDLER, O.**, 1972, Peptidoglycan types of bacterial cell walls and taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.*, **36**, 407-477
- **SCLÖNFELD, H.**, 1926, Über die Beziehungen der einzelnen Bestandteile der Frauenmilch zur Bifidusflora. *Jb. Kinderheilk.*, **113**, 19
- **SEKA ASSY, N.**, 1982, Contribution à l'étude des facteurs bifidigènes présents dans le lait maternel. Thèse Universitaire Lille, France
- **SGORBATI, B., LENAZ, G. and CASALICCHIO, F.**, 1976, Purification and properties of two fructose-6-phosphate phosphoketolase in *Bifidobacterium*. *J. Microbiol. Serol.*, **42**, 49-57
- **SLAYTER, H.S., WOLD, J.K. and MIDTVEDT, T.**, 1991, Intestinal mucin of germ-free rats. Biochemical and electron-microscopic characterization. *Carbohydr. Res.*, **222**, 1-9

- **SMITH, N.W. and TUCKER, J.F.**, 1975, The effect of feeding diets containing permitted antibiotics on the faecal excretion of *Salmonella typhimurium* by experimentally infected chicks. *J. Hyg.*, **75**, 293-301
- **SMORAGIEWICZ, W., BIELECKA, M., BABUCHOWSKI, A., BOUTARD, A. et DUREAU, H.**, 1993, Les probiotiques. *Can. J. Microbiol.*, **39**, 1089-1095.
- **SOUMARMON, A., GRELAC, F. and LEWIN, M.J.M.**, 1983, Solubilisation of active ( $H^+$  +  $K^+$ )-ATPase from gastric membrane. *Biochim. Biophys. Acta*, **732**, 579-585
- **SPEZIALE, P., HOOK, M., WADSTROM, T. and TIMPL, R.**, 1982, Binding of collagen to *Staphylococcus aureus* Cowan I. *J. Bacteriol.*, **167**, 77-81
- **STARK, P.L. and LEE, A.**, 1982, The bacterial colonization of large bowel of preterm low birth weight neonates. *J. Hyg.*, **89** (1), 59-67
- **STROUS, G.J. and DEKKER, J.**, 1992, Mucin-Type glycoproteins. *C. R. Biochem. Mol. Biol.*, **27** (1/2), 57-92
- **SUZUKI, Y., KAIZU, H., YAMAGUCHI, Y. and NAKAZATO, H.**, 1991, Effects of yogurt and cultured milk made using *Bifidobacterium longum* on survival rates and serum constituents of ICR mice. *J. Jap. Soc. Nut. Food Sci.*, **44**, 177-182
- **SYMONS, H.**, 1994, Les bifidobactéries. *World Newsletter Danone* n°3
- **TAMURA, Z.**, 1983, Nutriology of bifidobacteria. *Bifidobacteria Microflora*, **2**, 3-16
- **TANAKA, R. and SHIMOSAKA, K.**, 1982, Investigation of the stool frequency in elderly who are bedridden and its improvement by ingesting bifidus yogurt. *Jpn. Geriatr.*, **19**, 577-582
- **TANAKA, R., TAKAYANA, H., MOROVOMI, M., KUROSHIMA, T., UHEYAMA, S., MATSUMOTO, K., KURODA, A. and MATAI, M.**, 1983, Effect of administration of TOS and *Bifidobacterium breve* 4006 on the human fecal flora. *Bifidobacteria Microflora*, **2**, 17-24
- **TANNOCK, G.W.**, 1983, The effect of dietary and environmental stress on the gastrointestinal microbiota. In "Human intestinal microflora in health and disease". Ed. D.J. hentges. Academic Press, New York. pp 517-539
- **THIERY, J.P.**, 1967, Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J. Microsc.*, **6**, 987-1018
- **TISSIER, H.**, 1900, Recherches sur la flore intestinale des nourrissons (état normal et pathologique). Thèse Université Paris, France
- **TOMODA, T., NAKANO, Y. and KAGEYAMA, T.**, 1983, Variation of intestinal *candida* of patients with leukemia and the effect of lactobacillus administration. *Shinkin to Shinkinsho*, **24**, 356-358

- **TOPOUZIAN, N. and BEZKOROVAINY, A.**, 1986, Iron uptake by *Bifidobacterium bifidum* var. *Pennsylvanicus*. The effect of sulfhydryl reagents and metal chelators. *I.R.C.S. Med. Sci.*, **14**, 275-276
- **TOWBIN, H., STAEBLIN, T. and GORDON, J.**, 1979, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **76**, 4350-4354
- **TZOUVELEKIS, L.S., MENTIS, A.F., MAKRIS, A.M., SPILIADIS, C., BLACKWELL, C. and WEIR, D.M.**, 1991, *In vitro* binding of *Helicobacter pylori* to human gastric mucin. *Infect. Immun.*, **59**, 4252-4254
- **UEDA, M., NOKAMOTO, S., NAKAR, R. and TAGAGI, A.**, 1983, Establishment of a defined minimal medium and isolation of auxotrophic mutants for *B. bifidum* ES5. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **29**, 103-114
- **VAN DER WAAIJ, D., BERGHUIS-DE VRIES, J.M. and LEKKERKERK-VAN DER WEES, J.E.C.**, 1971, Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic treated mice. *J. Hyg.*, **69**, 405-411
- **VEERKAMP, J.H., LAMBERT, R. and SAITO, Y.**, 1965, The composition of the cell wall of *Lactobacillus bifidus* var. *Pennsylvanicus*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **112** (1), 120-125
- **VEERKAMP, J.H.**, 1969, Catabolism of glucose and derivatives of 2 deoxy a-amino glucose in *Bifidobacterium bifidum* var. *Pennsylvanicus*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **129**, 257-263
- **VEERKAMP, J.H., HOELEN, G.E.J.M. and OPE DEN CAMP, H.J.M.**, 1983, The structure of a mannitol teichoic acid from *Bifidobacterium bifidum* var. *Pennsylvanicus*. *Biochem. Biophys. Acta*, **755**, 439-451
- **VOGEL, R.**, 1952, Untersuchungen zur Biologie von *Bacterium bifidum*. Inaugural dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität zur München, Munich, W. Germany.
- **WANG, M., STEERS, E. and NORRIS, R.S.**, 1963, Extracellular polysaccharide of mucoid *Lactobacillus bifidus*. *J. Bacteriol.*, **86**, 898-903.
- **WATKINS, W.M.**, 1980, Biochemistry and genetics of the ABO, Lewis and P blood group systems : *In "Advances in Human Genetics"*, Harris, H. and Hirschhorn, K., Eds., Plenum Press, New York; *Adv. Hum. Genet.*, **10**, pp 1-136 et 379-385
- **WILLEMEN, A.C.VEL., NAMAVAR, F., MARIAN, A., VERWEIJ-VAN VUGHT, J.J., PUBBEN, N.B.A. and MAC LAREN, D.M.**, 1986, Haemagglutination by the *Bacteroides fragilis* group. *J. Med. Microbiol.*, **21**, 105-107

- **YAMASHITA, M., SUSAKI, M., HAMADA, K. and UENO, H., 1976, Studies on growth promoting substances for *L. Bifidus* found in cultured medium of *E. Coli*. Nogeï Kagakukai Zasshu, 50, 481-487.**
- **YAMASAKI, S., MACHII, K., TSUYUKI, S., MOMOSE, N., KAWASHIMA, T. and UEDA, K., 1985, Immunological responses to monoassociated *Bifidobacterium longum* and their relation to prevention of bacterial invasion. Immunology, 56, 43-50**
- **YASUI, H., NAGAOKA, AA., MIKE, K., HAYAKAWA, K. and OHWAKI, M., 1992, Detection of *Bifidobacterium* strains that induce large quantities of IgA. Microbial Ecology in health and Disease, 5, 155-162**
- **YOSHIOKA, Y., YOSHIOKA, S., TAMURA, Z. and OHTA, T., 1968, Growth responses of *Bifidobacterium bifidum* to coenzym A : its precursors and carrot extract. Jpn. J. Microbiol., 12, 395-402**
- **YOSHIOKA, Y., 1971, Studies on *Lactobacillus bifidus* on the factor affecting the formation of bifidus flora in the intestinal tracts of infants. Rep. Res. Lab., snow Brand Milk, Prod. Co. Tokyo, 72, 1-114**
- **YOSHIOKA, Y., ISEKI, K. and FUJITA, K., 1983, Development and differences of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants. Pediatrics, 72 (3), 317-321**
- **YOSHIOKA, Y., FUJITA, K. and ISEKI, E., 1984, Bacterial flora of breast-fed infants . Pediatrics, 74 (4), 563**
- **YUHARA, T., ISOKIMA, S., TSUCHIYA, F. and MITSUOKA, T., 1983, On the intestinal flora of bottle-fed infant. Bifidobacteria Microflora, 2 (1) , 33-39**

# **Annexes**

## In Vitro Binding of *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082 to Mucosal Glycoproteins and Hemagglutinating Activity

I.F. Fontaine, E.A. Aissi, and S.J.-L. Bouquelet

Laboratory of Biological Chemistry, University of Sciences and Technologies of Lille, Villeneuve d'Ascq, France

**Abstract.** Adhesive properties of *Bifidobacterium bifidum* strain DSM 20082 were studied by the hemagglutination test and an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *B. bifidum* caused agglutination of human A, B, and O erythrocytes and rabbit erythrocytes, but the interactions were not specific of blood group antigens. The hemagglutination was inhibited by porcine gastric mucin and rat intestinal and colonic mucin. *B. bifidum* was shown to adhere to different immobilized mucosal glycoproteins and to glycophorin A, a specific erythrocyte membrane glycoprotein. The data obtained with many glycosylated components indicated that *B. bifidum* receptors involved in the hemagglutination test were not the same as those that adhere to mucus glycoproteins. The results suggest that the mucosal preparations contain receptors for specific bacterial adhesins, but their structures remain to be determined.

*Bifidobacterium bifidum* is a normal inhabitant of the human colon. It is well known that in the intestinal tract of breast-fed infants, *B. bifidum* forms the dominant anaerobic flora. There is often a significant decrease or even an absence of putrefactive or pathogenic bacteria. In this special case the infants seem to be protected against infectious diarrhea, and *B. bifidum* has been considered to exert beneficial influence on their hosts' health [3, 17, 18].

Before proliferation, bacteria must interact with intestinal structures. Adhesion of *B. bifidum* to the surface of the colon may occur by association of the bacteria with secreted mucus gel or by adherence with the underlying epithelium.

A better understanding of the relationships between the bifidobacteria and the intestinal tract may explain their beneficial effect on the physiology and well-being of the host.

Hemagglutination has been used extensively as an easy method for studying bacterial adherence to the cell surface [12, 14, 27]. We know that erythrocyte-membrane blood group antigens are present at the surface of many tissues, especially in mucins. After studying haemagglutinating properties of *B. bifidum*, we scan the ability of bacteria to adhere to the immobilized mucosal components by ELISA [7].

Because the composition of mucins varies from one region of the gut to another, mucins purified from rat intestinal [24] and rat colonic crude mucus [16, 20] and porcine gastric mucin were used as models. These substrates contain an oligosaccharidic structure quite similar to human colonic mucin [9, 25] except for sulfate components.

The oligosaccharide part of membrane components (glycoproteins, glycolipids) can be a receptor for bacterial adhesin [2, 5, 15]. Inasmuch as *B. bifidum* is known to possess exo- and endoglycosidase activities that are able to split the glycanic part of mucus glycoproteins [4, 10], the possible role played by released oligosaccharides in *B. bifidum* adhesion to mucus glycoproteins must be carefully taken into account.

The aim of this work is to demonstrate the specific association between *B. bifidum* and some structures at the surface of intestinal epithelial cells, that is, the secreted mucus gel. This paper describes preliminary results obtained with mucin adhesion studies by the hemagglutination test and ELISA test.

### Materials and Methods

**Bacterial strain.** *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082 was grown in an anaerobic fermenter (setric) in a medium containing 37 g

brain-heart broth/L; 10 g glucose/L; pH 6.8 at 37°C; under N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, 85/15 vol/vol [4]. The cells were harvested by centrifugation (7000 g, 15 min, 4°C). The pellet was suspended in 0.01 M sodium phosphate buffer, pH 7.4, containing 0.15 M NaCl (PBS). Cells were stored at -80°C in the presence of 10% glycerol (vol/vol). Before hemagglutination and adherence experiments, the cells were washed three times in PBS.

**Mucosal preparations.** Six Wistar female rats were sacrificed, and their intestines and caeca were removed and immediately washed in ice-cold PBS containing sodium azide (0.02%). The intestinal mucus was scraped off with the edge of a glass slide and mixed with 100 vol of ice-cold PBS. After homogenization by shaking at 4°C, the scraped mucus was suspended and centrifuged three times at 28,000 g for 15 min at 4°C. The supernatant containing soluble glycoprotein material was dialyzed overnight at 4°C against deionized water and then lyophilized. The yields were 776 mg for intestinal mucins and 176 mg for colonic mucins. The lyophilized fractions were solubilized in 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.8, then applied onto Sepharose 4B column (2.5 × 60 cm) and eluted at 10 ml/h with the same buffer. Fractions (5 ml) were collected, and aliquots were analyzed for carbohydrates and proteins. The glycoprotein-containing fractions were pooled, dialyzed overnight at 4°C against deionized water, and lyophilized.

**Chemical composition of mucins.** The percentage of carbohydrate in glycoproteins was estimated by the orcinol method [22]. The carbohydrate composition of glycoprotein fractions was determined quantitatively from the methyl glycoside trimethylsilyl derivatives [13] by gas liquid chromatography.

**Glycosidase activities from *B. bifidum*.** Glycosylase activities were estimated with whole cells and disrupted cells of *B. bifidum*. The disruption of the cell was realized as follows: 6 g of wet cells were suspended in 50 ml of 1 M phosphate buffer, pH 7.5, and submitted for 10 min at 4°C to a pulsed (0.3 s by s) ultrasonic treatment (Branson sonifier B30) with a frequency of 20 kHz and an amplitude of 30 μm. The extract was centrifuged at 4°C at 35,000 g to obtain clear crude extract. Glycosidase activities were tested by use of *p*-nitrophenyl glycosides for α- and β-D-galactosidases, N-acetyl-β-D-glucosaminidase, and N-acetyl α-D-galactosaminidase or methylumbelliferyl glycosides for α-D-neuraminidase and α-L-fucosidase. The susceptibility of glycoproteins towards glycosidases was estimated by incubating 5 mg of mucosal glycoprotein (gastric, intestinal, or colonic mucins) or nonmucus glycoprotein (α-1-acid glycoprotein, glycophorin A) in 900 μl of PBS with 100 μl of crude extract (1 mg of dry matter) or entire cells (10 mg of wet cells) for 1 h at 37°C. The released sugars were chromatographed on TLC (silicagel G60, Merck) in solvent system *n*-butanol/acetic acid/water (2:1:1 vol/vol). The carbohydrates were detected after spraying 0.2% orcinol in 20% sulfuric acid and heating them at 110°C for 10 min.

In order to destroy sugar-releasing activities, we treated bacteria by heat (bacteria suspended in PBS were incubated during different times: 30 s, 1 min, 2 min, 4 min, 15 min, and 30 min) in a waterbath at 100°C.

**Protease treatment of the cells.** The PBS-washed bacterial cells were suspended in 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.8, 10 mM CaCl<sub>2</sub>. Pronase E (Merck), accounting for 1% by weight of wet bacteria, was added; the mixtures were incubated at 40°C for different times (from 10 min up to 4 h) on a shaking waterbath and then centrifuged at 2000 g for 15 min. The pellets were washed three

times with PBS, resuspended in PBS, and assayed for hemagglutination and ability to adhere to mucin.

Glycosidase activities were also estimated after this treatment by the procedure described above.

**Hemagglutination (HA).** Human A, B, AB, and O erythrocytes and rabbit erythrocytes were harvested from defibrinated blood by centrifugation and washed three times with PBS. A suspension (2% vol/vol) of the packed cells obtained by centrifugation for 10 min at 100 g in PBS was used in the hemagglutination test. The bacteria to be tested were washed twice with PBS and were adjusted to 10<sup>7</sup> cells/ml of PBS with the aid of a Coulter counter. The erythrocyte suspension (50 μl) was mixed with 50 μl of a serial twofold dilutions of the bacteria suspension in wells of microtiter plates (Nunc Microwells), which were gently stirred for 2 h at room temperature. Control wells contained only erythrocytes in PBS. Hemagglutination was estimated by use of a range of estimation from 0 to 4+ (4+ showing complete agglutination).

**Antiserum.** Polyvalent antiserum was produced by sequential intramuscular (IM) injections of two rabbits. The animals were first injected with a suspension of washed *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082 (1 mg bacteria/1 ml of sterile 0.9% NaCl) emulsified in an equal volume of Freund's complete adjuvant. After 10 days, the animals were injected in the same manner with whole bacteria emulsified in an equal volume of Freund's incomplete adjuvant. Afterwards, three sequential injections were performed with washed bacteria in sterile 0.9% NaCl, the last one, 1 week before bleeding. Reactivity of the anti-*Bifidobacterium* immune serum was previously determined by the double immunodiffusion test of Ouchterlony [19].

**Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).** Wells of polystyrene microtiter plates (Nunc-Immuplate Maxisorp) were coated overnight at 4°C with 100 μl of glycoprotein solution (20 μg/ml in 100 mM sodium bicarbonate buffer, pH 9.6); glycoproteins were omitted from control wells. The unbound material was washed off with PBS containing 0.1% Tween 20 (vol/vol). The remaining sites in the glycoprotein-coated and control wells were blocked with 1% (wt/vol) bovine serum albumin (Serva) in the same buffer for 30 min at 37°C. After one washing with PBS-Tween 20, the plates were incubated with a bacterial suspension in PBS-Tween 20-BSA for 30 min at 37°C. Unbound bacteria were removed by four washings with PBS-Tween 20. Anti-*B. bifidum* rabbit immunoserum (100 μl, 1/1000 dilution) was then added, the plates were placed for 30 min at 37°C, and the wells were washed four times with PBS-Tween 20 and incubated with 100 μl of 1/2000 dilution of goat anti-rabbit immunoglobulins conjugated to peroxidase (Diagnostics Pasteur) for 30 min at 37°C. After three washings with PBS-Tween 20 and a last washing with PBS, 100 μl of an O-phenylenediamine solution (0.2 mg/ml) containing 1 μl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30% vol/vol)/ml in 0.1 M phosphate-citrate buffer, pH 5.4, were added as substrate and incubated at room temperature in the dark. After 5 min, the reaction was stopped with 50 μl of 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and the absorbance was recorded at 490 nm (Metertech Σ 960 Micro Elisa Autoreader). Our method is similar to the one described by Tzouveleakis [26].

**Inhibition experiments.** The inhibition of HA and adherence was assayed by treating the bacteria for 1 h at 37°C with different carbohydrate structures solubilized in PBS. The result was compared with a control without carbohydrate and a control without bacteria. The tested sugar structures were from porcine gastric mucin, rat intestinal and colonic mucin, glycophorin A, Lacto-N-tetraose, Lacto-

neo-N-tetraose, sialyl lacto-neo-N-tetraose, 2-acetamido-2-deoxy-3-O- $\beta$ -D-galactopyranosyl-D-galactopyranose, 2-acetamido-2-deoxy-3-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-D-galactopyranose, D-galactose-1-phosphate, N-acetyl-D-neuraminic acid, D-galactose, L-fucose, N-acetyl-D-glucosamine, D-glucosamine, N-acetyl-D-galactosamine, and D-galactosamine.

The porcine gastric mucin, the disaccharides, and the monosaccharides were from Sigma. Tetrasaccharides and glycoprotein A were respectively isolated in the laboratory from human milk and human erythrocytes.

## Results

**Partial purification of mucins.** The gel filtration of the solubilized components from rat intestinal and colonic mucus was performed on Sepharose 4B. The elution patterns showed five fractions. The high-molecular-weight fraction obtained at the void volume (F1) represented the purified native mucins (data not shown).

Rat intestinal and colonic mucin preparations respectively contained 4% and 2% of carbohydrates (Fuc, Gal, GalNAc, GlcNAc, NeuAc).

**Carbohydrates released from glycoproteins by *B. bifidum* glycosidases.** *B. bifidum* possesses sugar-releasing enzymes which are located at the cell surface membrane [1, 6]. During gastric mucin hydrolysis, it is possible to detect two oligosaccharides associated with some monosaccharides (galactose, fucose). Structural analysis (data not shown) of the disaccharides gave the following structures: Gal( $\beta$ 1-3)GalNAc and Gal( $\beta$ 1-3)GlcNAc. Our results are in agreement with the observation of Hoskins et al. [11] concerning the degradation of mucins by *Ruminococcus torques* strain IX-70. Neuraminic acid and N-acetylglucosamine were also released but not visualized on TLC after orcinol spraying. In the case of non-mucus glycoprotein, only monosaccharides were detected.

Glycosidase activities were destroyed by flash thermal treatment (30 s at 100°C) and by proteolysis (10 min with pronase at 37°C).

**Hemagglutinating activity.** The ability of *B. bifidum* to hemagglutinate was first tested. The mean number of bacteria required for agglutinating human (A, B, O) erythrocytes and rabbit erythrocytes was the same ( $568 \times 10^3$  cells/ml).

Supernatant obtained after centrifugation at 2000 g for 15 min from *B. bifidum* after incubation for 1, 2, and 24 h at 37°C in PBS did not show any hemagglutinating activity.

Monosaccharides (Fuc, Gal, GalNAc, NeuAc, Glc, GlcNAc, Gal-1-P) and disaccharides  $\beta$ Gal(1,3)GalNAc

and  $\beta$ Gal(1,3)GlcNAc present in studied mucins did not inhibit *B. bifidum* hemagglutinating activity. But three human milk tetrasaccharides (lacto-N-tetraose, lacto-N-neo-tetraose, and sialyl lacto-N-neo-tetraose) and the glycoprotein A and mucins from different origins (gastric mucin, intestinal and colonic mucus glycoproteins) inhibited this hemagglutinating activity (Table 1). The partial purification of mucin by Sepharose 4B column (F1) induced an increase of inhibition in comparison with crude mucus (Table 1).

**Adhesive activity.** Kinetic studies of *B. bifidum* adhesion to immobilized porcine gastric mucus glycoproteins at 37°C revealed that the adhesion quickly occurred and reached a maximum after 30 min (Fig. 1). Afterwards adhesion remained stable, but the nonspecific binding increased.

The adhesion of *B. bifidum* to immobilized glycoproteins changed with the source of glycoproteins (Fig. 2). *B. bifidum* bound better to gastric (24% of carbohydrates) and colonic (1% of carbohydrates) mucins than intestinal (4% of carbohydrates) mucins. The bacteria adhered to a lesser extent to glycoprotein A (2% of carbohydrates) and did not adhere to orosomucoid (45% of carbohydrates) and ovalbumin (4% of carbohydrates).

*Bifidobacterium bifidum* incubated in PBS for 24 h did not release binding substances, as can be shown by the ELISA test.

Table 1. Inhibition of bacterial adhesion to immobilized glycoproteins and hemagglutinating activity

Components	Minimum amount inhibiting hemagglutination (HA 3+) ( $\mu$ g/mL)	Minimum amount inhibiting adhesion (>20%) ( $\mu$ g/ml)
Intestinal mucus	658 $\pm$ 128	51 $\pm$ 26
F1	12.6 $\pm$ 8.8	28 $\pm$ 5.5
Colonic mucus	1313 $\pm$ 280	69 $\pm$ 16.7
F1	845 $\pm$ 280	7.1 $\pm$ 3.25
Stomach mucus	42 $\pm$ 12	10.5 $\pm$ 7
Lacto-N-tetraose	244 $\pm$ 39	4400 $\pm$ 960
Lacto-N-neotetraose	88 $\pm$ 33	2583 $\pm$ 520
Sialyl lacto-N-neotetraose	88 $\pm$ 33	2583 $\pm$ 520
Glycoprotein A	97 $\pm$ 21	67 $\pm$ 24

Bacteria ( $10^6$  cells/ml) in PBS buffer were incubated with inhibitor components in various concentrations for 1 h at 37°C, before studies on hemagglutinating and adhesive abilities. F1 represents the purified intestinal and colonic mucins obtained by gel filtration chromatography on Sepharose 4B. Values are means  $\pm$  standard deviations (five or more assays).

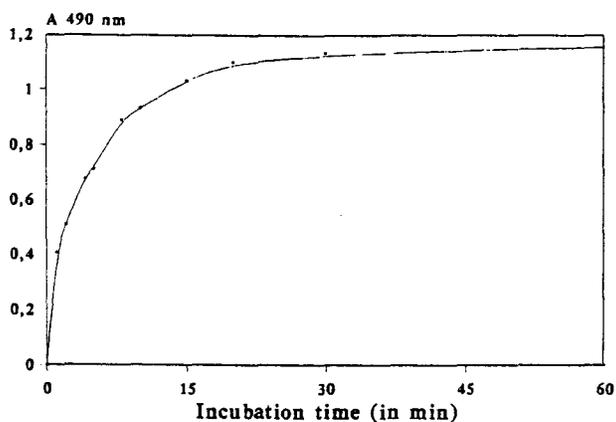


Fig. 1. Time-dependent binding of *B. bifidum* to immobilized porcine gastric mucin (2  $\mu\text{g}/\text{well}$ ). *B. bifidum* at  $10^6$  cells/ml was incubated with immobilized porcine gastric mucin at  $37^\circ\text{C}$ . At the indicated time intervals, bound bacteria were determined by the ELISA test. Values are means of five separate experiments and corrected for nonspecific binding.

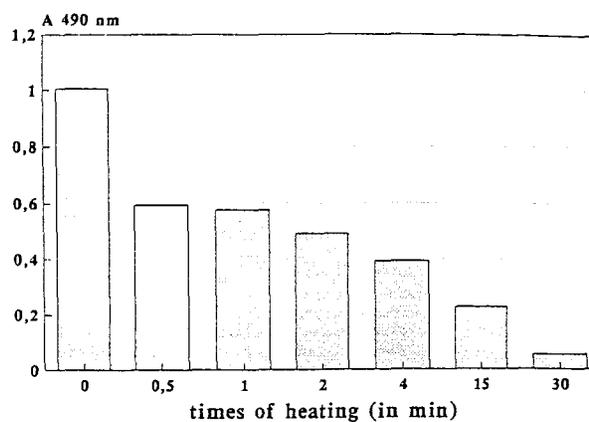


Fig. 3. Relationships between the adherence and the time of heating treatment ( $100^\circ\text{C}$ ) of the bacteria: bacteria ( $10^6$  cells/ml) heated during various times were incubated with immobilized porcine gastric mucin. Bound bacteria were determined by the ELISA test.

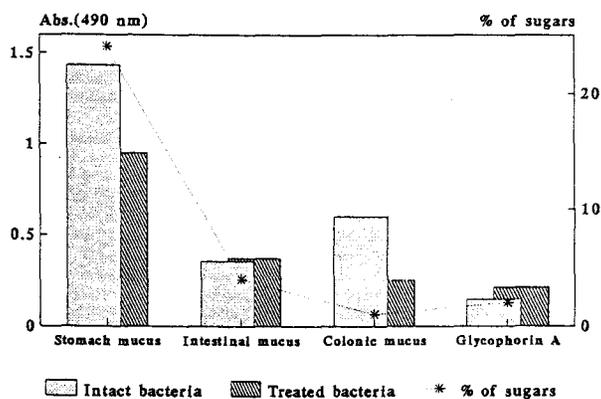


Fig. 2. Adhesion of *B. bifidum* to immobilized glycoproteins. Intact bacteria and heat-treated bacteria (1 min at  $100^\circ\text{C}$ ) were incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 30 min with immobilized glycoproteins. Bound bacteria were determined by the ELISA test. Sugars are estimated by the orcinol method.

Heat-treated bacteria bound less to immobilized glycoproteins than untreated ones (Fig. 3): *B. bifidum* bound as well to intestinal or colonic mucus glycoproteins as glycophorin A, but the adhesion to gastric mucus glycoproteins was the greatest.

Mono-, di- and tetrasaccharides did not inhibit *B. bifidum* adherence. As shown in Table 1, the incubation of *B. bifidum* with mucins prevented its binding to immobilized mucus glycoproteins. The gastric mucin is a powerful inhibitor in comparison with the other mucus glycoproteins.

**Comparison of hemagglutinating and adhesive activities.** The hemagglutinating activity of *B. bifidum* disappeared after heat shock treatment (30 s at  $100^\circ\text{C}$ ). Heat shock treatment of bacteria affected

their abilities to bind to immobilized glycoproteins less than their hemagglutinating activities (Fig. 3): the binding decreased by 40% after 30 s at  $100^\circ\text{C}$ . Increasing heating time slowly decreased the adherence, and heating for more than 30 min induced a total disappearance of adhesion.

Incubation of *B. bifidum* with pronase for 10 min resulted in a decrease of 25% of hemagglutinating activities but did not affect the adhesive properties. After pronase treatment for more than 4 h, *B. bifidum* lost its adherence and its hemagglutinating abilities.

*B. bifidum* recognized immobilized glycophorin A, and this glycoprotein inhibited the adhesion of bacteria to immobilized glycophorin A, but not to immobilized mucins.

We noticed that heat shock treatment (30 s at  $100^\circ\text{C}$ ) and pronase treatment for 10 min were sufficient to destroy the ability of bacteria to release oligosaccharides from mucus glycoproteins.

## Discussion

Because of its simplicity, the hemagglutination test greatly facilitated the study of interactions generated by bacteria.

*B. bifidum* binds as well to rabbit erythrocytes as to human A, B, O blood group erythrocytes. The interaction is independent of the blood group antigen. Nevertheless, the specificity of an oligosaccharidic interaction was demonstrated by specific inhibition with lacto-N-tetraose and lacto-N-neotetraose, independent of N-acetyl neuraminic acid. The structure of these human milk tetrasaccharides contains the type 1 and type 2 disaccharide units. Also, we

think that *B. bifidum*, like *Pseudomonas aeruginosa* [21], could recognize carbohydrate chains containing type 1  $\beta$ Gal(1,3)GlcNAc or type 2  $\beta$ Gal(1,4)GlcNAc disaccharide determinants common to human blood group erythrocytes and rabbit erythrocytes, but could not recognize the free disaccharides. The hemagglutination was also inhibited by porcine gastric mucin and rat intestinal and colonic mucin, glycoproteins whose structure contains these disaccharides.

Adherence properties of *B. bifidum* were studied with different glycoproteins. We observed that *B. bifidum* bound less to rat intestinal and colonic mucus glycoproteins than to porcine gastric mucin. This could be explained by the fact that the rat mucin purification by sepharose 4B chromatography was only partial; the preparation obtained by scraping from the mucosal surface was heavily contaminated with cell debris [8, 14, 24]. The low level of purification could also explain the low carbohydrate percentage (less than 10%) and, in this connection, the lesser extent in rat mucin recognition.

*B. bifidum* binds better to the O-glycosylproteins (gastric, colonic, and intestinal mucins) than N-glycosylproteins ( $\alpha$ -1-acid glycoprotein and ovalbumin) and N- and O-glycosylproteins (glycophorin A).

Prior incubation of *B. bifidum* with glycophorin A inhibits binding of bacteria to immobilized glycophorin A, whereas this treatment does not prevent attachment of bacteria to mucus glycoproteins. These results suggest that binding sites involved in the different interactions are not the same.

The hemagglutination-inhibiting sugars are without any effect on adhesion reaction. The level and nature of the glycan part involve a weak influence on adherence when glycoproteins are immobilized. This result is understood from the fact that heat denaturation and pronase digestion of the *B. bifidum* cell surface entail a loss of adhesive activity. The hemagglutination was more sensitive to the heat treatment than was the adhesion to immobilized glycoproteins. Indeed, we observed two phenomena: a rapid fall of adhesion after the enzymatic destruction and a slow decrease of adhesion from 1 up to 30 min. Beyond 30 min adhesion totally disappeared. We think that glycosidase activities are destroyed by flash heating, entailing nondegradation of the glycosidic part of glycoproteins (mucins or erythrocyte membrane glycoproteins). For higher heating time or prolonged pronase digestion, the peptidic structures involved in the bacteria-glycoprotein interactions must be affected (hydrolysis or denaturation).

We think that the interaction between *B. bifidum* and intestinal tract mucins depends highly on pep-

tidic structures rather than oligosaccharidic structures.

In this connection, it is known that mucus glycoprotein is constituted by a single protein backbone chain that is partly glycosylated and partly bare (non-glycosylated) [23]. According to these data, we propose the following model for mucin binding:

1. *B. bifidum* adhesins can react with accessible mucin-receptors (naked protein part)

2. *B. bifidum* adhesins can react to a higher extent with specific mucin receptors after prior deglycosylation of the glycosylated part of mucin.

The adhesion of *B. bifidum* to mucins appears to be a much more complex process than previously envisioned, consisting of the interactions of multiple adhesins, and their structure remains to be determined. Isolation of adhesins and interactions between bacteria and cultivated colonocytes are under investigation.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported in part by the Centre National de la Recherche Scientifique (UMR 111, Relations Structure-Fonction des Constituants Membranaires; Director, Professor André Verbert), by the Université des Sciences et Technologies de Lille. We are indebted to G. Strecker and P. Delannoy for providing us with milk tetrasaccharides and glycophorin A. We are indebted to D. Wallet for reviewing the English of this paper.

#### Literature Cited

1. Appourchaux IL (1989) Purification et Propriétés des Béta-D-galactonases et des N-acétyl-Béta-D-glucosaminidases de *Bifidobacterium bifidum* souche AA 2/2. Thesis, UST Lille Flandres Artois
2. Bock K, Breimer ME, Brignole A, Hansson GC, Karlss KA, Larson G, Leffler H, Samuelsson BC, Stromberg Svanborg-Eden C, Thurin J (1985) Specificity of binding of strain of uropathogenic *E. coli* to  $\alpha$ Gal(1,4)Gal containing glycosphingolipides. *J Biol Chem* 260:8545-8551
3. Bottazzi V (1989) Activité probiotique et thérapeutique des bactéries lactiques et des bifidobactéries. In: ARBBA (ed) *Bifidobacterium* et facteurs bifidogènes, rôle en santé humaine, Symposium international "Bifidobacterium et santé," Paris, pp 9-31
4. Boutry E (1989) Exoglycosidases de *Bifidobacterium bifidum* souche AA 2/2. Thesis, UST Lille Flandres Artois
5. Chadee K, Johnson ML, Orozco E, Petri WA, Ravdin J (1988) Binding and internalization of rat colonic mucins by the galactose/N-Acetyl-D-galactosamine adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis* 158:398-406
6. Dumortier V (1990) La réaction de Transgalactosylation chez *Bifidobacterium bifidum* souche AA 2/2. Thesis, UST Lille Flandres Artois
7. Engvall E, Permman P (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), quantitative assay of IgG. *Immunochemistry* 8:871-874
8. Gum JR, Hicks JW, Lagace RE, Byrd JC, Toribara NW, Siddiki B, Fearney FJ, Lamport DTA, Kim YS (1991) Molecu-

- lar cloning of rat intestinal mucin. *J Biol Chem* 266:22733-22738
9. Hase T, Sutoh K, Takahashi K (1992) Isolation and partial characterization of human and porcine gastric mucins. *Biomed Res* 13:149-154
  10. Hoskins LC, Agustines M, Mc Kee W, Boulding ET, Kriaris M, Niedermeyer G (1985) Isolation and properties of fecal strains that degrade A, B, H blood group antigens and oligosaccharides from mucin glycoproteins. *J Clin Invest* 75:944-953
  11. Hoskins LC, Boulding ET, Gerken TA, Harouny VR, Kriaris MS (1992) Mucin glycoprotein degradation by mucin-oligosaccharide-degrading strains of human faecal bacteria. Characterization of saccharide cleavage products and their potential role in nutritional support of larger faecal bacterial populations. *Microb Ecol Health Dis* 5:193-207
  12. Jones GW, Rutter JM (1974) The association of K88 antigen with haemagglutinating activity in porcine strains of *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* 84:135-144
  13. Kamerling JP, Gerwing GJ, Vliegenthart JFG, Clamp JR (1975) Characterization by gas liquid chromatography mass spectrometry of pertrimethylsilyl glycosides obtained in the methanolysis of glycoproteins and glycolipids. *Biochem J* 151:491-495
  14. Katsuji O, Michiyo O, Tetsuo K (1989) Neuraminidase enhanced attachment *Bacteroides intermedius* to human erythrocytes and buccal epithelial cells. *Infect Immun* 57:1635-1637
  15. Krivan HC, Clark GF, Smith DF, Wilkins TD (1986) Cell surface binding site for clostridium difficile enterotoxin: evidence for a glycoconjugate containing the sequence  $\alpha$ Gal(1,3) $\beta$ Gal(1,4)GlcNAc. *Infect Immun* 53:573-581
  16. Lamont JT, Ventola AS (1980) Purification and composition of colonic epithelial mucin. *Biochim Biophys Acta* 626:234-243
  17. Mata LJ, Mejicanos ML, Jimenez F (1972) Studies on the indigenous gastrointestinal flora of Guatemalan children. *Am J Nutr* 25:1380-1390
  18. Mitsuoka T (1990) Bifidobacteria and their role in human health. *J Ind Microbiol* 6:263-268
  19. Ouchterlony Ö (1962) Diffusion in gel methods for immunological analysis (II). *Prog Allergy* 6:30-154
  20. Podolsky DK, Isselbacher K (1983) Composition of human colonic mucin. *J Clin Invest* 72:142-153
  21. Ramphal R, Carnoy C, Fievre S, Michalski J-C, Houdret N, Lamblin G, Strecker G, Roussel P (1991) *Pseudomonas aeruginosa* recognizes carbohydrate chains containing type 1  $\beta$ Gal(1,3)GlcNAc or type 2  $\beta$ Gal(1,4)GlcNAc disaccharide units. *Infect Immun* 59:700-704
  22. Rimington C (1940) Seromucoid and the bound carbohydrate of the serum proteins. *Biochem J* 34:931-940
  23. Silberberg A (1989) Mucus glycoprotein, its biophysical and gel-forming properties In: Chantler E, Ratcliffe NA (eds) *Mucus and related topics*. Cambridge: Society for Experimental Biology, pp 43-63
  24. Slayter HS, Wold JK, Midtvedt T (1991) Intestinal mucin of germ-free rats. Biochemical and electron-microscopic characterization. *Carbohydr Res* 222:1-9
  25. Slomiany A, Zdebska E, Slomiany BL (1984) Structures of the neutral oligosaccharides isolated from A-active human gastric mucin. *J Biol Chem* 259:14743-14749
  26. Tzouveleki LS, Mentis AF, Makris AM, Spiliadis C, Blackwell C, Weir DM (1991) In vitro binding of *Helicobacter pylori* to human gastric mucin. *Infect Immun* 59:4252-4254
  27. Vel WAC, Namavar F, Marian A, Verweij-Van Vught JJ, Pubben NBA, Maclaren DM (1986) Haemagglutination by the *Bacteroides fragilis* group. *J Med Microbiol* 21:105-107

