

N° d'ordre :

Université des Sciences et Technologies de Lille

Thèse

présentée par

Frédéric KRZEWINSKI

pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université

Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé



Transport et Métabolisme des saccharides chez *Bifidobacterium* *bifidum* DSM 20082

Présentée le 22 Janvier 1997 devant la commission d'examen

Président : Professeur André VERBERT

Rapporteurs : Professeur Bruno BIAVATI
Docteur François SCHNEIDER

Examineurs : Docteur Monique ZAGOREC
Docteur Françoise GAVINI
Professeur Stéphane BOUQUELET

A mes parents,
en gage de mon affection et de ma reconnaissance.

A mes soeurs, mon frère et les pièces rapportées,
A mes amis,
pour votre présence.

A monsieur le Professeur André VERBERT,

Pour m'avoir accueilli dans votre laboratoire et
présider le jury de cette thèse, je vous prie de croire en
l'expression de mes plus vifs remerciements.

A monsieur le Docteur Bruno BIAVATI,

Vous m'avez fait l'honneur d'accepter de juger ce
travail et d'en prendre la responsabilité de rapporteur
malgré votre éloignement. Recevez mes sincères
remerciements.

A monsieur le Docteur François SCHNEIDER,

Vous avez accepté avec bienveillance de juger ce
travail et d'en prendre la responsabilité de rapporteur.
Soyez assuré de mes plus profonds remerciements.

A madame le Docteur Monique ZAGOREC,

Vous avez accepté de participer au jury de cette
thèse. Je vous remercie pour l'intérêt que vous portez à ce
travail.

A madame le Docteur Françoise GAVINI,

Vous m'avez tout appris de la bactériologie lors de mes fréquents passages dans votre laboratoire. Ce fut un réel plaisir de travailler au sein de votre équipe. Soyez assuré de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

A monsieur le Professeur Stéphane BOUQUELET,

Voilà un peu plus de cinq ans que j'ai intégré votre groupe. Vous y faites régner un esprit d'entraide et d'amitié. Grâce à votre encadrement et votre rigueur scientifique, vous m'avez permis d'acquérir de solides bases déterminantes pour la suite de ma carrière. Pour tous ce que vous m'avez apporté, veuillez accepter mes plus profonds remerciements et toute ma sympathie.

A monsieur le Docteur Jean-François MAINGONNAT,

Pour votre participation aux expériences de microcalorimétrie, votre sympathie ainsi que pour l'intérêt que vous portez à ces travaux, je vous remercie vivement.

Je tiens à remercier plus particulièrement,

Ginette BACHELET et Antoinette FOURMENT

Votre accueil et votre gentillesse qui m'ont permis de m'intégrer rapidement dans votre équipe. Vous avez toujours été disponible pour m'aider lors de mes travaux.

Eliane AÏSSI, Colette BRASSART et Myriam LECOCQ

Votre sympathie, votre gentillesse et vos services rendus au quotidien m'ont aidé à réaliser ce travail dans de très bonnes conditions. Soyez assuré de ma sympathie.

Danielle et Isabelle

Vous êtes mes complices depuis mon arrivée au 207. Vous avez su m'aider et me supporter durant ces premières années de recherche. Je vous remercie pour tous ces bons moments passés ensemble.

Je tiens à remercier le Professeur BOHIN et son groupe, Anne, Sabine, Silvia, Eric, Fred, Jean Marie, Laurent et Philou pour m'avoir procuré les *Escherichia coli* et permis l'accès au microscope.

Enfin, je tiens à remercier tous les membres du laboratoire de Chimie Biologique, pour leur soutien technique, leurs conseils et la sympathie qu'ils m'ont toujours témoignée.

Ce travail a été réalisé sous la direction de monsieur le Professeur Stéphane BOUQUELET dans le laboratoire de Chimie Biologique (Relations structure-fonction des constituants membranaires, unité Mixte de Recherche n°111 du CNRS, Directeur : Professeur André VERBERT) de l'Université des Sciences et Technologies de Lille.

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 :

Publications :

DRON, D.; **KRZEWINSKI, F.**; BRASSART, C. and BOUQUELET, S.

Phosphorylase from *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082 : Characterization, partial purification and relation to mucin.

soumis à publication dans J. Biol. Chem.

KRZEWINSKI, F.; BRASSART, C.; GAVINI, F. and BOUQUELET, S.

Glucose and galactose transport in *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082.

soumis à publication dans Anaerobe

KRZEWINSKI, F.; BRASSART, C.; GAVINI, F. and BOUQUELET, S.

Characterization of the lactose transport system in *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082.

Curr. Microbiol., **32**, 301-307, 1996.

Communications par affiche :

KRZEWINSKI, F.S.; BRASSART, C.M. et BOUQUELET, S. J-L.

Caractérisation du transport du lactose chez *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082.

IV congrès national de la Société Française de Microbiologie à Tours du 2 au 5 mai 1995.

DRON, D.; BRASSART, C.; **KRZEWINSKI, F.** and BOUQUELET, S.

Evidence and Characterization of a new enzyme in *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082 : a "galacto-phosphorylase" in relation with mucin degradation.

6th joint meeting of the nederlandse vereniging voor de bestudering van glycoconjugaten, the studiengruppe glykokonjugate der gesellschaft fuer biologische chemie and the groupe lillois de glycobiologie, Lille, 19-20 septembre 1994.

DRON, D.; BRASSART, C.; **KRZEWINSKI, F.** et BOUQUELET, S.

Caractérisation d'une galacto-phosphorylase de *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082.

XXI ème Forum des jeunes la chercheurs de Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire, Reims, 5-8 juillet 1994.

ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adénosine 5'-TriPhosphate
<i>B.</i>	<i>Bifidobacterium</i>
CCCP	Carbonyl Cyanide m-ChloroPhénylhydrazone
DCC	N,N'-DiCyclohexylCarbodiimide
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und zellkulturen GmbH
FOS	Fructo-OligoSaccharide
Fru	fructose
Gal	galactose
Gal α -1P	galactose- α -1-phosphate
GalNAc	N-acétylgalactosamine
Glc	glucose
GlcNAc	N-acétylglucosamine
GOS	Gluco-OligoSaccharide
IPTG	IsoPropyl β -D-ThioGalactopyranoside
NCFB	National Collection of Food Bacteria
<i>p</i> -DMAB	aldéhyde DiMéthylAmino-4-Benzoïque
PEP	PhosphoEnolPyruvate
<i>p</i> NP-Gal	para-NitroPhényl- β -D-galactopyranoside
TOS	Transgalacto-OligoSaccharide
TPY	milieu Trypticase-Phytone Yeast
YIT	Collection privée Yakult Institute
qsp	Quantité Suffisante Pour

TABLE DES MATIERES

INDEX DES FIGURES.....	6
INDEX DES TABLEAUX	9
INTRODUCTION.....	11
GENERALITES.....	14
I- LES BIFIDOBACTERIES	15
<i>A-Biologie du genre Bifidobacterium</i>	15
1-Morphologie.....	16
a-Action des saccharides.....	16
b-Action des sels :	16
c-Action des acides aminés :	18
2-Composition de la paroi	18
a-Le peptidoglycane	18
b-La membrane cytoplasmique.....	20
c-Les polysaccharides	21
3-Caractéristiques physiologiques	21
a-La température et le pH	21
b-Anaérobiose.....	21
c-Résistance aux antibiotiques	23
4-Taxonomie	23
a-Caractères phénotypiques	24
b-Composition du peptidoglycane.....	25
c-Caractérisation des protéines.....	25
d-Composition en cytosine-guanine et hybridation ADN-ADN	26
e-Conclusion	27
<i>B-Ecologie des bifidobactéries</i>	27
1-Habitat.....	30
2-Implantation des bifidobactéries chez l'homme.....	30
a-Etablissement des bifidobactéries chez le nouveau-né.....	30
b-Evolution des bifidobactéries chez l'Homme	31
<i>C-Milieus de culture</i>	33
1-Besoins azotés.....	33
2-Besoins minéraux.....	33
3-Besoins vitaminiques	35
4-Les "facteurs bifidogènes"	35
a-Facteur de Petuely	36
b-Facteur BF1	36
c-Facteur BF2.....	36

d-Les protéines.....	37
e-Les oligosaccharides.....	37
f-Conclusion.....	38
5-Glycosidases et métabolisme des saccharides.....	38
a-Glycosidases.....	38
b-Métabolisme des saccharides.....	39
D-Les bifidobactéries : pathogénicité et effets probiotiques.....	44
1-Pathogénicité.....	44
2-Rôle et utilisation des bifidobactéries.....	46
a-Rôle des bifidobactéries.....	46
b-Utilisation des bifidobactéries comme bactéries probiotiques.....	47
c-Autres utilisations des bifidobactéries.....	49
II-TRANSPORTS MEMBRANAIRES DES SACCHARIDES.....	49
A-Les différents types de transport chez les procaryotes.....	51
1-Diffusion.....	51
a-Diffusion passive.....	51
b-Diffusion facilitée.....	51
2-Transport actif.....	53
3-La translocation de groupe.....	54
a-HPr.....	54
b-Protéine EI.....	54
c-Protéines II.....	57
B-Le transport des saccharides.....	58
1-Transport du lactose.....	58
2-Transport du glucose.....	59
3-Transport du galactose.....	59
4-Transport du fructose.....	60
5-Transport de la N-acétylglucosamine.....	61
6-Conclusion.....	62
C-Régulation du transport des saccharides.....	62
1-Régulation chez les entérobactéries.....	62
2-Régulation chez les bactéries à Gram positif.....	64
MATERIELS ET METHODES.....	67
I-SOUCHE BACTERIENNE ETUDIE.....	68
II-CONDITIONS DE CULTURE.....	68
A-Milieu Trypticase Phytone Yeast (TPY).....	68
B-Milieu TPY-agar.....	69
C-Milieu de Garches modifié.....	69
D-Conditions de culture.....	69
III-DOSAGES DES SACCHARIDES.....	70
A-Dosage des oses neutres.....	70
1-principe.....	70

2-Mode opératoire.....	70
<i>B-Dosage des N-acétylhexosamines.....</i>	<i>71</i>
1-Principe	71
2-Réactifs	71
3-Mode opératoire.....	71
IV-DÉTERMINATION DU MODE D'INCORPORATION DES SACCHARIDES.....	72
<i>A-Principe.....</i>	<i>72</i>
<i>B-Les différents saccharides utilisés.....</i>	<i>72</i>
<i>C-Le transport des saccharides.....</i>	<i>72</i>
<i>D-Inhibition du transport</i>	<i>73</i>
1-Par des inhibiteurs spécifiques des translocases	73
2-Par d'autres structures saccharidiques	74
<i>E-Incorporation des saccharides</i>	<i>74</i>
<i>F-Influence du donneur d'énergie sur l'incorporation des saccharides.....</i>	<i>75</i>
1-Principe	75
2-Réactifs	75
3-Perméabilisation des cellules	75
4-Incubation.....	76
5-Précipitation des saccharides phosphorylés.....	76
<i>G-Détermination des paramètres cinétiques de l'incorporation.....</i>	<i>76</i>
V-DOSAGE DES PROTÉINES.....	76
<i>A-Les protéines solubles.....</i>	<i>77</i>
<i>B-Les protéines insolubles.....</i>	<i>77</i>
VI-ACTIVITÉ β-D-GALACTOSIDASIQUE.....	77
<i>A-Principe.....</i>	<i>77</i>
<i>B-Mode opératoire</i>	<i>77</i>
VII-ASSIMILATION DES SACCHARIDES.....	78
<i>A-Dosage des saccharides.....</i>	<i>78</i>
<i>B-Quantification du dégagement de chaleur par microcalorimétrie.....</i>	<i>78</i>
1-Principe	79
2-Mode opératoire.....	80
VIII-FORMATION DES UNITES DISACCHARIDIQUES	80
<i>A-Etude de la β-1,3 galactosyl-N-acétylhexosamine phosphorylase</i>	<i>80</i>
1-Analyse des différents produits de la réaction.....	81
2-Détermination des paramètres cinétiques de la réaction de transfert.....	81
3-Détermination des paramètres cinétiques de la réaction de phosphorylase.....	82
<i>B- Production des disaccharides.....</i>	<i>82</i>
1-Optimisation des conditions d'incubation.....	82
2-Synthèse des disaccharides	83
RESULTATS ET DISCUSSION	84
I-CROISSANCE DES BIFIDOBACTÉRIES.....	85

<i>A-Croissance en milieu TPY</i>	85
<i>B-Croissance en milieu de Garches modifié</i>	88
<i>C-Discussion</i>	91
II-LA FORMATION DU LACTO-N-BIOSE.....	95
<i>A-Détermination des paramètres cinétiques</i>	97
<i>B-Synthèse des deux unités disaccharidiques</i>	98
III-TRANSPORT DU GLUCOSE.....	98
<i>A-Détermination des paramètres cinétiques</i>	100
<i>B-Type de transport</i>	100
1-Action des inhibiteurs de translocases.....	100
2-Influence des cations sur l'incorporation du glucose.....	103
3-Influence du donneur d'énergie.....	105
4-Spécificité de transporteur.....	105
<i>C-Composés intracellulaires formés à partir du glucose</i>	107
<i>D-Discussion</i>	107
IV-TRANSPORT DU LACTOSE.....	109
<i>A-Induction</i>	109
<i>B-Détermination des paramètres cinétiques</i>	110
<i>C-Hydrolyse du lactose intracellulaire après incorporation</i>	112
<i>D-Type de transport</i>	112
1-Action des inhibiteurs de translocases.....	112
2-Spécificité de transporteur.....	116
<i>E-Discussion</i>	116
V-TRANSPORT DU GALACTOSE.....	118
<i>A-Induction</i>	118
<i>B-Détermination des paramètres cinétiques</i>	120
<i>C-Incorporation du galactose</i>	120
<i>D-Activité galactokinase</i>	120
<i>E-Mécanisme de transport</i>	122
<i>F-Discussion</i>	122
VI-TRANSPORT DU FRUCTOSE.....	124
<i>A-Induction</i>	124
<i>B-Mécanisme du transport</i>	124
1-Action des inhibiteurs de translocase.....	126
2-Influence de l'ATP et du phosphoenolpyruvate.....	126
3-Influence des sels.....	128
4-Spécificité de transporteur.....	128
<i>C-Incorporation du fructose</i>	128
<i>D-Discussion</i>	131
VII-TRANSPORT DE LA N-ACÉTYLGLUCOSAMINE.....	132
<i>A-Induction</i>	132

<i>B-Mécanisme d'incorporation</i>	132
1-Action des inhibiteurs de translocases	132
2-Influence du phosphoénolpyruvate et de l'ATP	135
3-Influence des sels	135
4-Spécificité de transporteur	137
<i>C-Métabolisme de la N-acétylglucosamine intracellulaire</i>	137
<i>D-Discussion</i>	140
VIII-TRANSPORT DU LACTO-N-BIOSE	142
<i>A-Mécanisme d'incorporation</i>	142
1-Action des inhibiteurs de translocases	142
2-Influence de l'ATP et du phosphoénolpyruvate	144
3-Spécificité de transporteur	144
<i>B-Dégradation du lacto-N-biose intracellulaire</i>	146
<i>C-Discussion</i>	146
IX-RÉGULATION DU TRANSPORT DES SACCHARIDES	148
<i>A-Influence des saccharides entre eux</i>	148
<i>B-Discussion</i>	148
CONCLUSIONS GENERALES	151
BIBLIOGRAPHIE	159

INDEX DES FIGURES

Figure 1 : Observation en microscopie électronique de <i>Bifidobacterium bifidum</i> DSM 20082 (formes bâtonnets).	17
Figure 2 : Observation en microscopie électronique de <i>Bifidobacterium bifidum</i> DSM 20082 (formes bifides).	17
Figure 3 : Représentation schématique de l'enveloppe cellulaire des bactéries à Gram positif.	19
Figure 4 : Influence du type d'allaitement sur la composition de la flore du nourrisson selon Mitsuoka et Kaneuchi, 1977.	32
Figure 5 : Différences entre les populations bactériennes retrouvées dans les fèces, en fonction de l'âge (Mitsuoka et Hayakawa, 1972).	34
Figure 6 : Voie de dégradation des monosaccharides chez les bifidobactéries (SHUNT BIFIDE)	41
Figure 7 : Voie alternative de la dégradation du pyruvate	42
Figure 8 : Les différentes voies de conversion du galactose en glucose-6-phosphate.	43
Figure 9 : La voie métabolique de la N-acétylglucosamine adaptée de Veerkamp <i>et al.</i> , 1969.	45
Figure 10 : Représentation schématique des différents types de transport par diffusion	52
Figure 11 : Représentation schématique des différents types de transport actif.	55
Figure 12 : Mécanisme de transport des saccharides par translocation de groupe.	56
Figure 13 : Mode de répression du transport des sucres chez les bactéries à Gram positif selon Saier <i>et al.</i> , 1996.	66
Figure 14 : Thermogramme obtenu lors d'une culture de <i>Bifidobacterium bifidum</i> en TPY sans saccharide.	86
Figure 15 : Thermogramme obtenu lors d'une culture de <i>Bifidobacterium bifidum</i> en TPY + N-acétylglucosamine.	87
Figure 16 : Thermogramme obtenu lors d'une culture de <i>Bifidobacterium bifidum</i> en TPY + N-acétylgalactosamine.	87
Figure 17 : Thermogramme obtenu lors d'une culture de <i>Bifidobacterium bifidum</i> en TPY + glucose.	89

Figure 18 : Thermogramme obtenu lors d'une culture de <i>Bifidobacterium bifidum</i> en TPY + galactose.	89
Figure 19 : Thermogramme obtenu lors d'une culture de <i>Bifidobacterium bifidum</i> en TPY + lactose.	90
Figure 20 : Thermogramme obtenu lors d'une culture de <i>Bifidobacterium bifidum</i> en TPY + fructose.	90
Figure 21 : Thermogramme obtenu lors d'une culture de <i>Bifidobacterium bifidum</i> en Garches modifié + N-acétylglucosamine.	92
Figure 22 : Thermogramme obtenu lors d'une culture de <i>Bifidobacterium bifidum</i> en Garches modifié + N-acétylgalactosamine.	92
Figure 23 : Thermogramme obtenu lors d'une culture de <i>Bifidobacterium bifidum</i> en Garches modifié + glucose.	93
Figure 24 : Thermogramme obtenu lors d'une culture de <i>Bifidobacterium bifidum</i> en Garches modifié + galactose.	93
Figure 25 : Thermogramme obtenu lors d'une culture de <i>Bifidobacterium bifidum</i> en Garches modifié + lactose.	94
Figure 26 : Thermogramme obtenu lors d'une culture de <i>Bifidobacterium bifidum</i> en Garches modifié + fructose.	94
Figure 27 : Formation du lacto-N-biose en fonction du temps d'incubation.	99
Figure 28 : Détermination des paramètres cinétiques de l'incorporation du glucose (représentation de Lineweaver et Burk).	101
Figure 29 : Influence des inhibiteurs de translocase sur l'incorporation du glucose.	102
Figure 30 : Influence de la concentration en chlorure de potassium sur l'incorporation du glucose.	104
Figure 31 : Profil de migration des composés radioactifs intracellulaires après une incubation en présence de glucose.	108
Figure 32 : Détermination des paramètres cinétiques de l'incorporation du lactose (représentation de Lineweaver et Burk).	111
Figure 33 : Chromatogramme des composés radioactifs intracellulaires après une incubation en présence de lactose.	113
Figure 34 : Influence des inhibiteurs de translocases sur l'incorporation du lactose.	114
Figure 35 : Représentation schématique du mécanisme de transport du lactose et de la formation du gradient de protons.	119
Figure 36 : Incorporation du galactose.	121

Figure 37 : Profil de migration des composés radioactifs intracellulaires après une incubation en présence de galactose.	121
Figure 38 : Représentation schématique du système de transport du galactose.	125
Figure 39 : Influence des inhibiteurs de translocases sur l'incorporation du fructose.	127
Figure 40 : Chromatogramme des composés radioactifs intracellulaire après une incubation en présence de fructose.	130
Figure 41 : Représentation schématique du mécanisme de transport du fructose et de sa régulation.	133
Figure 42 : Influence des inhibiteurs de translocases sur la pénétration de la N-acétylglucosamine.	134
Figure 43 : Profil chromatographique des composés radioactifs intracellulaires après une incubation en présence de N-acétylglucosamine.	139
Figure 44 : Représentation schématique des mécanismes possibles de transport de la N-acétylglucosamine.	141
Figure 45 : Influence d'inhibiteurs de translocases sur l'incorporation du lacto-N-biose.	143
Figure 46 : Profil chromatographique des composés radioactifs intracellulaires après une incubation en présence de lacto-N-biose.	147
Figure 47 : Bilan des différents mécanismes d'incorporation des saccharides.	154

INDEX DES TABLEAUX

Tableau I : Structure des polysaccharides isolés de bifidobactéries.	22
Tableau II : Souches type et habitat des espèces du genre <i>Bifidobacterium</i> .	28
Tableau III : Evolution de la fréquence des espèces de <i>Bifidobacterium</i> en fonction des différents groupes d'âge.	34
Tableau IV : Propriétés biologiques exprimées par les bifidobactéries.	50
Tableau V : Les différents types de transports des sucres chez les bactéries	63
Tableau VI : Chaleur totale dégagée lors des cultures de bifidobactéries en milieu TPY.	96
Tableau VII : Chaleur totale dégagée lors des cultures de bifidobactéries en milieu de Garches modifié.	96
Tableau VIII : influence des ions sur l'incorporation du Glucose.	104
Tableau IX : Incorporation du glucose en fonction du donneur d'énergie.	106
Tableau X : Influence des saccharides sur l'incorporation du glucose.	106
Tableau XI : Activité β -D-galactosidasique et incorporation du lactose en fonction des conditions de culture.	111
Tableau XII : Influence de l'ATP et du phosphoénolpyruvate sur la phosphorylation du lactose.	117
Tableau XIII : Influence des saccharides sur l'incorporation du lactose.	117
Tableau VIX : Action de l'ATP ou du phosphoénolpyruvate sur la phosphorylation du galactose.	123
Tableau XV : Incorporation du galactose en fonction des inhibiteurs de translocases.	123
Tableau XVI : Influence de l'ATP ou du phosphoénolpyruvate sur la phosphorylation du fructose.	129
Tableau XVII : influence des ions sur l'incorporation du fructose	129
Tableau XVIII : Influence des saccharides sur l'incorporation du fructose	130
Tableau XIX : Phosphorylation de la N-acétylglucosamine en fonction du donneur d'énergie	136
Tableau XX : influence des ions sur l'incorporation de la N-acétylglucosamine.	136
Tableau XXI : Influence des saccharides sur l'incorporation de la N-acétylglucosamine.	138

Tableau XXII : Phosphorylation du lacto-N-biose en fonction du donneur d'énergie. 145

Tableau XXIII : Influence des saccharides sur l'incorporation du β -D-Gal (1,3) GlcNAc. 145

Tableau XXIV : Inhibition des systèmes de transport par d'autres saccharides. 149

Introduction

Depuis une quinzaine d'années, les laits fermentés aux bifidobactéries ont connu un véritable engouement chez les consommateurs. L'industrie laitière ne cesse de vanter leurs qualités organoleptiques ainsi que leurs effets bénéfiques en leur attribuant le label "aliment-santé". Ces activités bénéfiques reposent sur de nombreux mécanismes dont la production de métabolites, la stimulation du système immunitaire et la modification des sites de fixation de bactéries pathogènes.

Pour mieux comprendre le rôle joué par les micro-organismes au niveau des muqueuses, Hoskins et son équipe ont étudié la dégradation des mucines par certaines bactéries intestinales (Hoskins et Boulding, 1981; Miller et Hoskins, 1981; Hoskins *et al.*, 1992). La flore colique spécifique dispose de nombreuses exoglycosidases et endoglycosidases susceptibles de libérer les saccharides constituant la partie glucidique des mucines. Lors de cette dégradation, Hoskins *et al.* (1992) mettent en évidence l'accumulation de deux disaccharides (β -D-Gal (1,3) GlcNAc et β -D-Gal (1,3) GalNAc) obtenus grâce à la présence d'endo-N-acétylhexosaminidases bactériennes. De plus, ces deux disaccharides ne sont que faiblement dégradés dans le milieu extracellulaire.

Crociani *et al.* (1994) ont démontré que *Bifidobacterium bifidum* est susceptible de fermenter les mucines gastriques de Porc. Au laboratoire, nous avons mis en évidence que *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082 était doué des mêmes propriétés mais qu'il pouvait de surcroît transformer les disaccharides caractérisés par Hoskins *et al.* (1992). Notre intérêt a d'autant été plus grand quand nous avons remarqué que ces structures (Lacto-N-biose) n'étaient pas hydrolysés par une β -D-galactosidase extracellulaire mais par une enzyme intracellulaire, la β -1,3 galactosyl-N-acétylhexosamine phosphorylase. Cette dégradation intracellulaire impliquait un passage membranaire. C'est à partir de cette observation que nous nous sommes intéressés au système de transport de ces disaccharides renfermant du galactose associé soit à de la N-acétylglucosamine soit à de la N-acétylgalactosamine.

Avant de nous intéresser au transport de ces disaccharides, nous avons successivement étudié celui :

- du glucose qui nous servira de système modèle
- du lactose car il présente une analogie de structure avec les disaccharides obtenus par dégradation biologique des mucines.

Puis est venu s'ajouter l'étude du transport des saccharides suivants : galactose et N-acétylglucosamine, monosaccharides constituant les disaccharides ou le lactose, ces structures peuvent être obtenus par une hydrolyse extracellulaire.

Nous escomptons par cette étude pouvoir obtenir des informations concernant l'utilisation des prébiotiques dans certains produits alimentaires. A ce niveau, il faut rappeler qu'on utilise assez souvent des oligosaccharides de transglycosylation comme les TOS (transgalacto-oligosaccharides), les FOS (fructo-oligosaccharides) et les GOS (gluco-oligosaccharides). Ces produits favoriseraient la prolifération des bifidobactéries (Gibson et Roberfroid, 1995).

Avant de rapporter les résultats que nous avons obtenus concernant le transport des saccharides au travers de la membrane de *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082, ainsi que ceux résultant de l'étude de la consommation des saccharides par microcalorimétrie, nous essayerons de faire un état de nos connaissances concernant les bifidobactéries.

Généralités

I- LES BIFIDOBACTERIES

Les bifidobactéries ont été isolées en 1900 par Tissier lors d'études sur les fèces de nouveau-nés. Elles sont appelées alors, *Bacillus bifidus* vue leur morphologie particulière en forme de "Y". Des travaux effectués par Moro et son équipe, à la même époque et dans des conditions similaires, ont permis d'isoler des bactéries qu'ils classent dans le genre *Lactobacillus* (Moro, 1900). Ces deux premières études ont abouti à une dénomination commune, *Lactobacillus bifidus* (Holland, 1920). C'est en 1924, que pour la première fois, le nom de *Bifidobacterium bifidum* fut utilisé par Orla-Jensen. Mais ce nom ne fut pas conservé par les autres équipes qui utilisèrent d'autres appellations (*Tissiera bifida*, *Nocardia bifida*, *Actinomyces bifidum*, *Cohnistrephothrix bifidus* ou encore *Corynebacterium bifidum* et bien sûr *Lactobacillus bifidus* var. *pennsylvanicus*). Le genre *Bifidobacterium* a fait son apparition en 1974 dans le "Bergey's manual" qui recense à cette époque, 11 espèces (Buchanan et Gibbons, 1974).

Les bifidobactéries ont connu deux grandes époques. La première est marquée par des travaux sur leur caractérisation morphologique (Tissier, 1900; György, 1957), la mise au point de milieux de culture (Petuely, 1956), l'étude de facteurs de croissance (György *et al.*, 1953; Petuely, 1956; György, 1957; Raynaud *et al.*, 1959) et leur utilisation en santé infantile (Tissier, 1900; Manciaux, 1958).

La seconde s'est efforcée d'étudier les caractères physiologiques (Reuter, 1963; 1971; Mitsuoka, 1984) et biochimiques des bifidobactéries (Exterkate et Veerkamp, 1969; Exterkate *et al.*, 1971; Mitsuoka, 1982), la composition de leur ADN (Sebald *et al.*, 1965) ainsi que les taux d'homologie ADN-ADN entre les espèces (Scardovi *et al.*, 1970; Scardovi, 1974).

Nous nous efforcerons de faire le point sur les connaissances actuelles concernant ces germes, et nous développerons les aspects biologiques, écologiques et nutritionnels ainsi que leurs utilisations dans les secteurs de la santé et de l'agro-alimentaire.

A-Biologie du genre *Bifidobacterium*

Les bifidobactéries sont des bactéries anaérobies, à Gram positif, asporogènes, immobiles sous forme de bâtonnets incurvés aux contours irréguliers. Elles ne possèdent pas d'activité catalase, ne dégradent pas les noyaux indols et ne réduisent pas les nitrates. Elles font partie de la flore dominante du colon. Dans cette première partie, nous essayerons de donner les principales caractéristiques physiologiques, morphologiques ainsi que les données actuelles sur la taxonomie du genre *Bifidobacterium*.

1-Morphologie

La forme particulière des bifidobactéries permit à Tissier en 1900 de mettre en évidence dans les fèces de nouveau-nés, la présence d'une bactérie ayant la forme d'un "Y" ou d'un "V". Cette forme dite "Bifide" leur donna leur nom. Elles peuvent aussi se présenter sous la forme de petits bacilles réguliers, sous la forme de bâtonnets incurvés aux contours irréguliers ou sous forme coccoïde. Leurs extrémités sont effilées, bifurquées ou spatulées. Ce pléomorphisme est en relation étroite avec les espèces et les conditions de culture.

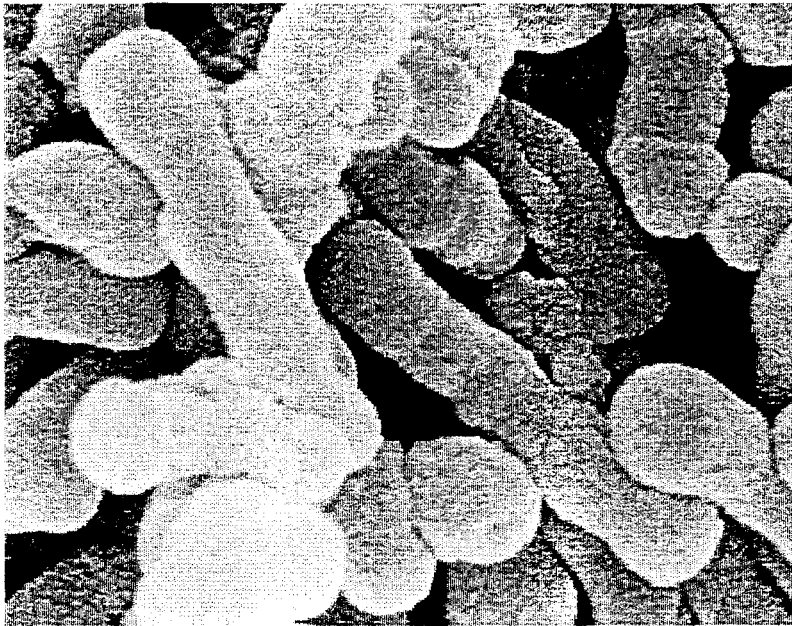
Dans leur revue générale, Poupard *et al.* (1973) ont rassemblé les différentes formes dans lesquelles il est possible de visualiser les bifidobactéries. Lors d'une culture en conditions défavorables, le pléomorphisme augmente (Figure 1 et 2, page 17).

a-Action des saccharides

Dans des milieux déficitaires en N-acétylglucosamine, constituant principal du peptidoglycane, *Bifidobacterium bifidum* var. *pennsylvanicus* privilégie la formation des formes bulbeuses (Glick *et al.*, 1960), alors qu'un taux élevé de saccharides N-acétylés entraîne la disparition des formes dites "bifide".

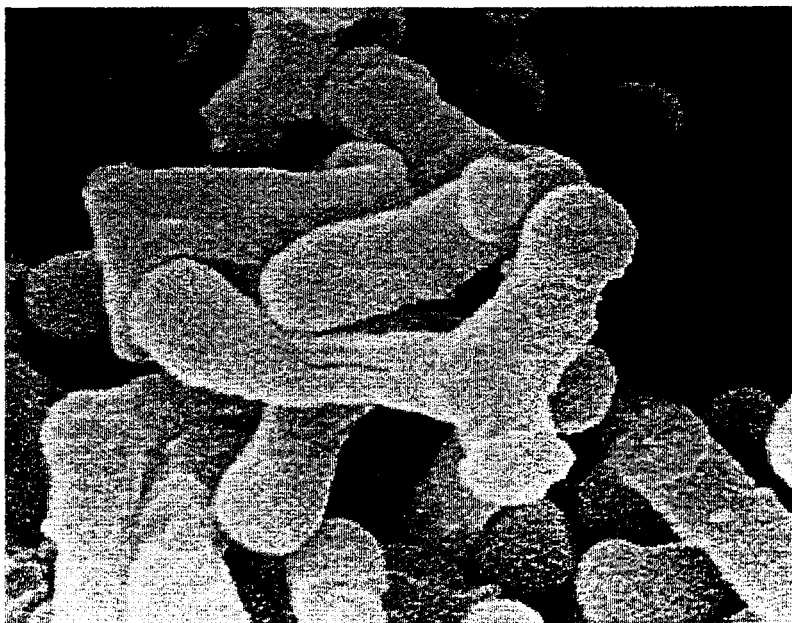
b-Action des sels :

L'acétate, le sulfate et les chlorures d'ions monovalents induisent la forme "bifide" chez *Lactobacillus bifidus* (Kojima *et al.*, 1968). La teneur en CaCl_2 provoque un



x 28 000

Figure 1 : Observation en microscopie électronique de *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082 (formes bâtonnets)



x 28 000

Figure 2 : Observation en microscopie électronique de *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082 (formes bifides)

changement de forme des bifidobactéries, en effet la paroi des formes "bifides" renferme moins de Ca^{2+} que celle des formes bacillaires (Kojima *et al.*, 1970 a,b).

✕ c-Action des acides aminés :

Les bifidobactéries cultivées en milieu minimum se retrouvent essentiellement sous la forme "bifide", mais l'ajout d'acide glutamique, d'acide aspartique et d'alanine entraîne l'apparition des formes bacillaires (Husain *et al.*, 1972). Ces trois acides aminés interviennent directement dans la formation du peptidoglycane, mais aucune preuve n'a été apportée quant à la variation du taux de ces acides aminés en fonction de la morphologie des bifidobactéries (Cummins *et al.*, 1957; Veerkamp *et al.*, 1965).

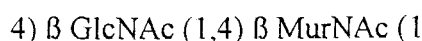
✎ 2-Composition de la paroi

La paroi des bifidobactéries est composée comme toutes les bactéries à Gram positif d'un peptidoglycane et d'une membrane plasmique (Figure 3, page 19). C'est une paroi épaisse et homogène. De nombreux acides téichoïques sont connectés au niveau du peptidoglycane lui-même ou aux lipides de la membrane plasmique, et dans ce cas on les nomme acides lipotéichoïques. Deux grandes équipes ont analysé la paroi chez les bifidobactéries. Veerkamp et ses collaborateurs, ainsi que Kandler et son équipe ont permis une meilleure compréhension de la structure de cette paroi chez les bifidobactéries (Veerkamp, 1971; Veerkamp *et al.*, 1983; Kandler et Lauer, 1974; Kandler *et al.*, 1968).

✎ a-Le peptidoglycane

Le peptidoglycane confère à la bactérie sa rigidité, il est constitué principalement d'acide N-acétyl muramique et de N-acétylglucosamine pour la partie saccharidique et d'alanine, d'acide glutamique, d'ornithine et de lysine pour la partie peptidique (Veerkamp, 1971; Koch *et al.*, 1970a).

✎ La partie saccharidique est constituée d'un disaccharide de répétition relié entre eux par des liaisons β (1,4) glycosidique :



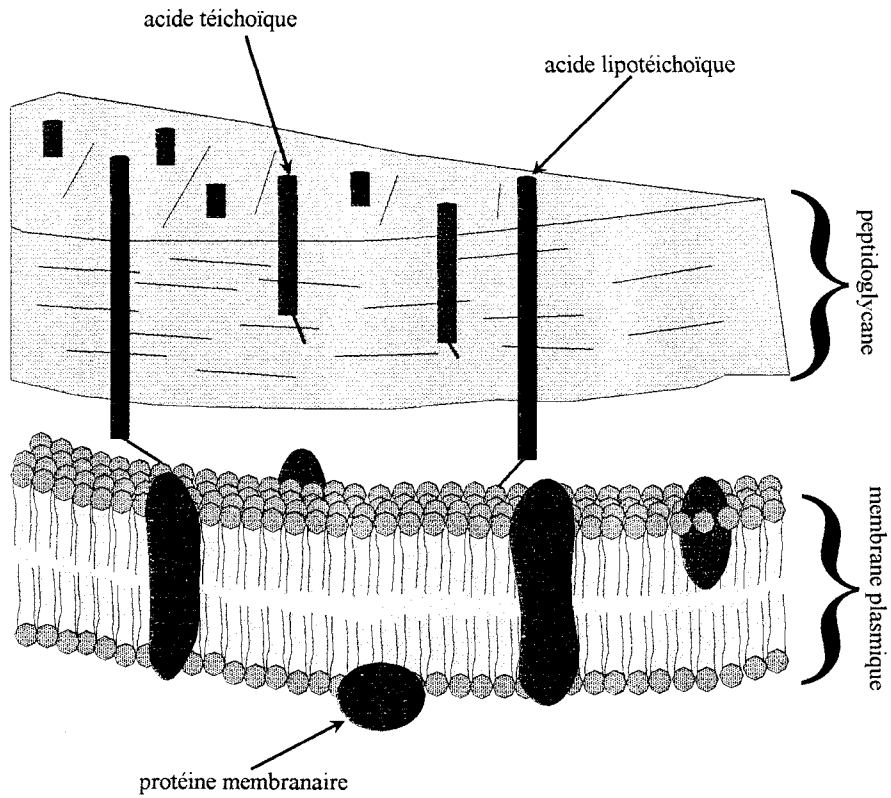
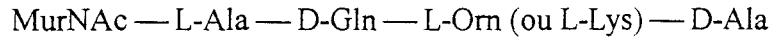


Figure 3 : Représentation schématique de l'enveloppe cellulaire des bactéries à Gram positif.

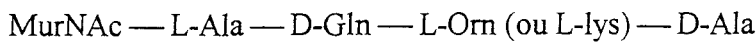
Ce motif vient se greffer sur la partie peptidique par l'intermédiaire d'une liaison amide contractée entre l'acide N-acétyl muramique et des résidus de L-alanine.

↪ La partie peptidique peut être divisée en deux séquences :

-une séquence constante (Kandler et Lauer, 1974) chez toutes les bifidobactéries composée de :



|
séquence variable



-une séquence variable comprenant entre autres, des résidus de sérine, alanine, thréonine, d'acide aspartique ou de glycolle (Koch *et al.* 1970a; 1970b; Kandler *et al.*, 1968). Cette séquence variable a permis de classer et d'identifier certaines espèces ou groupements d'espèces (Kandler et Lauer, 1974).

↪ b-La membrane cytoplasmique

La membrane cytoplasmique de *Bifidobacterium bifidum* apparaît comme une structure de neuf nanomètres d'épaisseur, composée de trois feuillets superposés (Vaisman *et al.*, 1978). De nombreuses invaginations sont présentes à l'intérieur du cytoplasme, elles sont appelées mésosomes.

Plusieurs rôles ont été envisagés pour ces mésosomes, ils auraient un rôle dans la division cellulaire (Greenawalt et Whiteside, 1975). Higgins et son équipe, par contre pensent que la présence de ces mésosomes est artéfactuelle, elle serait due aux techniques de préparation des bactéries pour l'observation en microscopie électronique (Higgins *et al.*, 1981)

La présence ou non de ces structures mésosomales sembleraient, en outre, dépendre de l'espèce et des conditions de culture.

Comme chez toutes les bactéries à Gram positif, des acides téichoïques sont greffés sur les lipides de la membrane et donnent des acides lipotéichoïques qui confèrent aux bifidobactéries un caractère hydrophobe (Op den Camp *et al.*, 1985).

c-Les polysaccharides

Les polysaccharides du peptidoglycane représentent la partie variable de cette structure. Le premier polysaccharide, dont la structure fut effectuée chez *Bifidobacterium bifidum* ssp. *pennsylvanicus* est un polysaccharide neutre (Veerkamp *et al.*, 1983). La structure des polysaccharides de plusieurs espèces humaines a été déterminée (Tableau I, page 22), elle varierait selon l'espèce. L'étude de la structure de ces polysaccharides a pris un nouvel essor depuis les travaux de l'équipe de Sekine (1985) démontrant l'activité anti-tumorale d'une préparation de paroi de bifidobactéries.

3-Caractéristiques physiologiques

a-La température et le pH

La température de culture varie selon l'origine des bifidobactéries. Les espèces d'origine humaine ont une température optimale de croissance comprise entre 37 et 41°C. Pour des températures supérieures à 45°C, la croissance bactérienne est nulle.

Chez la majorité des souches d'origine animale, la température optimale peut être supérieure à 45°C (Buchanan et Gibbons, 1974; Gavini *et al.*, 1991). Aucune croissance n'est détectée pour des températures inférieures à 25°C.

Le pH optimum de croissance des bifidobactéries est compris entre 6 et 7. Ce sont des bactéries acidophiles, le pH (pH 5) peut être utilisé en tant que facteur de sélection dans les milieux de culture (Beerens, 1990). La croissance est inhibée pour des valeurs de pH inférieures à 5 et supérieures à 8 (Scardovi, 1986).

b-Anaérobiose

Tableau I : Structure des polysaccharides isolés de bifidobactéries.

Souche	Structure du polysaccharide		référence
<i>Bifidobacterium breve</i> YIT 4010	$\begin{array}{c} \rightarrow 3) \beta \text{ Glc } (1 \rightarrow 3) \beta \text{ Gal } (1 \rightarrow 4) \alpha \text{ Gal } (1 \rightarrow 2) \alpha \text{ Glc } (1 \rightarrow \\ \quad \$		

Les bifidobactéries sont des micro-organismes anaérobies stricts. Elles sont sensibles à la présence d'oxygène, mais certaines espèces et souches y sont tolérantes en présence de gaz carbonique.

L'oxygène de l'air peut agir de deux manières différentes :

-soit en augmentant le potentiel d'oxydoréduction. L'oxygène ne serait pas létal dans ce cas pour les bifidobactéries, mais l'élévation du potentiel d'oxydo-réduction empêcherait la croissance de certaines souches (Rasic et Kurmann, 1983).

-soit en produisant de l'eau oxygénée qui est un inhibiteur de la Fructose-6-phosphate phosphocétolase, enzyme clé du métabolisme des saccharides chez les bifidobactéries (De Vries et Stouthamer, 1969). La tolérance à l'oxygène dans ce cas peut s'expliquer par la capacité à détruire l'eau oxygénée (présence d'une légère activité catalase chez *Bifidobacterium asteroides* et *Bifidobacterium indicum* selon Scardovi et Trovatelli, 1969) ou d'empêcher sa formation (présence de NADH oxydase).

c-Résistance aux antibiotiques

L'étude de la résistance aux antibiotiques des différentes espèces de bifidobactéries permet de pouvoir agir dans les rares cas où certaines bifidobactéries peuvent être pathogènes, de comprendre l'altération de la flore intestinale lors d'une antibiothérapie, mais surtout de définir des milieux sélectifs pour leur isolement (Lim *et al.*, 1993).

Les bifidobactéries sont résistantes à la kanamycine, la néomycine, la streptomycine, la polymycine, la gentamycine, l'acide nalidixique et le métronidazole (Scardovi, 1986). Miller et Finegold, en 1967, ont établi la liste des antibiotiques inhibant la croissance des bifidobactéries, et plus précisément celle de *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum* et *Bifidobacterium adolescentis*. On peut donc citer, la bacitracine, le chloramphénicol, l'ampicilline et la pénicilline. L'action de la tétracycline dépend de l'espèce et de la souche étudiée (Matteuzzi *et al.*, 1983).

4-Taxonomie

Les bifidobactéries ont longtemps fait l'objet d'une confusion entre les processus de classification et d'identification. La définition au niveau genre était fondée sur la morphologie des bactéries (Poupard *et al.*, 1973). L'une des premières classifications des espèces a reposé sur l'étude de la fermentation des saccharides (Malyoth et Bauer, 1950). D'autres équipes ont fondé la classification au niveau espèce, sur l'analyse de la composition en guanine-cytosine de l'ADN (Sebald *et al.*, 1965), sur l'étude de la composition du peptidoglycane (Kandler, 1970), sur la mise en évidence de protéines spécifiques (Scardovi et Trovatelli, 1965) et plus récemment sur la technique d'hybridation ADN-ADN (Scardovi *et al.*, 1970).

a-Caractères phénotypiques.

En 1957, Dehnert, a été le premier à présenter une classification en 5 groupes des bifidobactéries, basée sur la fermentation de 24 saccharides. Les souches d'origine humaine sont ensuite divisées en huit espèces, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium parvulum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium lactentis*, *Bifidobacterium liberorum*, *Bifidobacterium adolescentis* et *Bifidobacterium longum* (Reuter, 1963).

Les profils de fermentation des saccharides ne permettent pas de différencier *Bifidobacterium dentium*, *Bifidobacterium adolescentis* (*sensu stricto*), *Bifidobacterium angulatum* et *Bifidobacterium catenulatum* décrites par Scardovi et Crociani (1974). Ces quatre espèces étaient regroupées sous le nom de *Bifidobacterium adolescentis* (*sensu lato*), et dès 1984, Mitsuoka insiste sur la nécessité de réaliser des tests phénotypiques pour identifier ces espèces.

Mitsuoka propose en 1969, une classification des bifidobactéries d'origines humaine et animale. La différenciation entre les souches d'origines humaine et animale s'effectue par la capacité des bifidobactéries d'origine animale à croître à 46,5°C, alors que les bifidobactéries d'origine humaine en sont incapables.

Récemment, Gavini *et al.* (1991) ont réalisé une classification par analyse numérique et ont différencié les espèces différentes d'origines humaine et animale, par la fermentation de quarante-neuf saccharides, quatre-vingt neuf tests enzymatiques et la capacité à croître à 45°C.

b-Composition du peptidoglycane

La structure du peptidoglycane des bifidobactéries a été étudiée par les équipes de Kandler (Kandler *et al.*, 1968; Kandler, 1970) et Veerkamp (Veerkamp *et al.*, 1965; Veerkamp, 1971). Il est composé principalement de N-acétylglucosamine et d'acide N-acétylmuramique pour les monosaccharides et, pour la partie peptidique, d'alanine, d'acide glutamique et de lysine (Veerkamp, 1971; Koch *et al.*, 1970 a). Depuis les années 80, il est reconnu que le peptidoglycane comporte aussi bien de l'ornithine que de la lysine (Bezkorovainy, 1989). La présence et la quantité de lysine, d'ornithine, d'acide aspartique, de thréonine et de sérine peuvent caractériser une espèce (Kandler et Lauer, 1974). L'ensemble de ces travaux a permis de séparer certaines espèces selon la séquence peptidique de leur peptidoglycane. Il faut toutefois relativiser cette classification car il est possible que deux espèces possèdent la même séquence peptidique (*Bifidobacterium longum* et *Bifidobacterium infantis*; Koch *et al.* 1970 b).

c-Caractérisation des protéines

Les protéines utilisées pour cette classification sont la fructose-6-phosphate phosphocétolase (EC 4.1.2.22), la transaldolase (EC 2.2.1.2) et la 6-phosphogluconate deshydrogénase (EC 1.1.1.44).

La fructose-6-phosphate phosphocétolase existe sous trois formes qui pourraient être spécifiques de l'origine de la souche (humaine ou animale; Scardovi *et al.*, 1971a). Cette enzyme est l'enzyme clé de la voie métabolique de genre *Bifidobacterium* mais de récents travaux ont démontré la présence de cette enzyme chez d'autres microorganismes comme *Gardnerella vaginalis* (Gavini *et al.*, 1996).

La transaldolase et la 6-phosphogluconate deshydrogénase sont des enzymes du métabolisme des saccharides qui donnent le plus d'isoenzymes. Elles sont donc très intéressantes pour l'étude taxonomique du genre *Bifidobacterium*. La plupart des espèces possèdent une seule bande en SDS PAGE pour chaque enzyme, et quand elles sont multiples, cette multiplicité est spécifique de l'espèce. Scardovi et son équipe ont dénombré sur 1206 souches la présence de quarante isoformes de la transaldolase et de dix-neuf pour la 6-phosphogluconate deshydrogénase (Scardovi et Sgorbati, 1974; Scardovi *et al.*, 1979a). En 1982, l'électrophorèse des protéines solubles de 1092 souches de bifidobactéries a permis de constater la présence d'une bande commune à toutes les

souches étudiées à l'exception de *Bifidobacterium boum*, de confirmer l'existence de *Bifidobacterium minimum* et *Bifidobacterium subtile*, et de plus, une assez bonne corrélation a pu être établie avec d'autres techniques de classification (Biavati *et al.*, 1982).

Les relations entre les différentes espèces et les protéines (isoformes de la transaldolase et de la 6-phosphogluconate déshydrogénase) pourront être améliorées par l'utilisation de réactions immunologiques croisées à l'aide d'antisérums spécifiques. Les distances immunologiques entre espèces déterminées par des antisérums de huit transaldolases purifiées, ont fait apparaître huit groupes en corrélation avec la répartition écologique (humaine, animale, eaux usées et abeille) (Sgorbati et London, 1982).

d-Composition en cytosine-guanine et hybridation ADN-ADN

Les bifidobactéries se différencient des lactobacilles par un G+C mol% compris entre 55 et 67% (Scardovi, 1986) à l'exception de *Bifidobacterium inopinatum* (45%; Crociani *et al.*, 1996).

La classification du genre *Bifidobacterium* fondée sur les pourcentages d'homologie entre les ADN des différentes espèces a été réalisée pour la première fois, par Scardovi et son équipe en 1970 (Scardovi *et al.*, 1970; 1971b). Pour appartenir à la même espèce, deux souches doivent avoir un pourcentage d'homologie supérieur ou égal à 70%, avec une variation du profil d'élution thermique inférieure à 5°C (Wayne *et al.*, 1987).

Ces travaux permirent de subdiviser une espèce en plusieurs espèces ou de regrouper plusieurs espèces en une seule. L'espèce *Bifidobacterium adolescentis* (*sensu lato*) décrite par Mitsuoka (1969), a été divisée en cinq espèces, *Bifidobacterium adolescentis* (*sensu stricto*), *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium angulatum*, *Bifidobacterium dentium* et *Bifidobacterium pseudocatenulatum* (Scardovi et Crociani, 1974; Scardovi *et al.*, 1979b).

Bifidobacterium infantis, *Bifidobacterium liberorum* et *Bifidobacterium lactentis* sont regroupées désormais sous la seule dénomination *Bifidobacterium infantis* (Scardovi *et al.*, 1971b), les espèces *Bifidobacterium thermophilum* et *Bifidobacterium ruminale* sont regroupées sous le nom de *Bifidobacterium thermophilum* (Zani *et al.*, 1974; Lauer et Kandler, 1983). De plus, Lauer et Kandler (1983) regroupent deux espèces provenant d'abeille; l'ADN de la souche *Bifidobacterium indicum* partage 100% d'homologie avec celle de *Bifidobacterium coryneforme*. Mais à ce jour, elles sont toujours classées comme deux espèces bien distinctes (Crociani *et al.*, 1996).

e-Conclusion

La classification et l'identification fondées sur l'étude de la composition du peptidoglycane (Kandler et Lauer, 1974), de la fermentation des saccharides sans analyse numérique (Mitsuoka, 1969) et de la sérologie (Sgorbati et London, 1982) devraient être abandonnées. Ces techniques doivent être utilisées lors d'étude taxonomique plus large englobant d'autres tests et non comme seules techniques de référence.

Si la classification des différentes espèces est maintenant à peu près établie à ce jour, leur identification pose encore des problèmes. Il est impossible de séparer du point de vue phénotypique, *Bifidobacterium longum* de *Bifidobacterium infantis* ou *Bifidobacterium catenulatum* de *Bifidobacterium pseudocatenulatum* (Gavini, communication personnelle).

Seule, aujourd'hui, en France, la galerie ID 32A (Biomérieux-département API) permet l'identification de bactéries anaérobies. Elle inclut trois groupes dans le genre *Bifidobacterium*, *Bifidobacterium* sp., deux groupes de *Bifidobacterium adolescentis*, sans valeur taxonomique. Si la galerie ne peut actuellement identifier une espèce, elle est fiable au niveau genre.

Dans ce cas, seule la technique d'hybridation ADN-ADN reste la technique de référence.

A ce jour, l'ensemble des travaux de classification a permis d'identifier vingt-neuf espèces, douze d'origine humaine, quinze d'origine animale et deux isolées d'eaux usées (Tableau II, pages 28 et 29).

B-Ecologie des bifidobactéries

L'ensemble des trente espèces provient de niches écologiques diverses. Nous essayerons dans cette deuxième partie d'étudier leurs différents habitats et la variation des espèces tout au long de la vie de l'Homme.

Tableau II : Souches type et habitat des espèces du genre *Bifidobacterium*.Origine humaine

Espèces	Souches type	Habitats
<i>B. adolescentis</i> (Reuter, 1963)	E194a (=ATCC 15703, DSM 20083)	Fèces adulte
<i>B. angulatum</i> (Scardovi et Crociani, 1974)	B677 (=ATCC 27535, DSM 20098)	Fèces adulte
<i>B. bifidum</i> (Orla-jensen, 1924)	Ti (=ATCC 29521, DSM 20456)	Fèces enfant, adulte et vagin
<i>B. breve</i> (Reuter, 1963) syn : <i>B. parvolulorum</i>	SI (=ATCC 15700, DSM 20213)	Fèces enfant et vagin
<i>B. catenulatum</i> (Scardovi et Crociani, 1974)	B669 (=ATCC 27539 DSM 20103)	Fèces enfant, adulte et vagin
<i>B. denticolens</i> (Crociani <i>et al.</i> , 1996)	B3028 (=DSM 10105)	Caries dentaires
<i>B. dentium</i> (Scardovi et Crociani, 1974)	B764 (=ATCC 27534, DSM 20436)	Caries dentaires, cavité orale et fèces adulte
<i>B. gallicum</i> (Lauer, 1990)	P6 (=ATCC 49850, DSM 20093)	Fèces adulte
<i>B. infantis</i> (Reuter, 1963) syn : <i>B. liberorum</i> et <i>B. lactentis</i>	S 12 (=ATCC 15697, DSM 20088)	Fèces enfant et vagin
<i>B. inopinatum</i> (Crociani <i>et al.</i> , 1996)	B3109 (=DSM 10107)	Caries dentaires
<i>B. longum</i> (Reuter, 1963)	E194b (=ATCC 15707, DSM 20219)	Fèces enfant, adulte et vagin
<i>B. pseudocatenulatum</i> (Scardovi <i>et al.</i> , 1979b)	B 1279 (=ATCC 27919, DSM 20438)	Fèces enfant

Origine environnementale

Espèces	Souches type	Habitats
<i>B. minimum</i> (Scardovi et Trovatelli, 1974)	F392 (=ATCC 27538, DSM 20102)	Eaux usées
<i>B. subtile</i> (Scardovi et Trovatelli, 1974)	F395 (=ATCC 27537, DSM 20096)	Eaux usées

Origine animale

Espèces	Souches type	Habitats
<i>B. animalis</i> (Mitsuoka, 1969)	R 101-8 (=ATCC 25527, DSM 20104)	Fèces rat, poule, lapin, veau
<i>B. asteroides</i> (Scardovi et Trovatelli, 1969)	C51 (=ATCC 25910, DSM 20089)	Abeille
<i>B. boum</i> (Scardovi <i>et al.</i> , 1979b)	Ru 917 (=ATCC 27917, DSM 20432)	Rumen de bovin, fèces de porcelet
<i>B. choerinum</i> (Scardovi <i>et al.</i> , 1979b)	Su 806 (=ATCC 27686, DSM 20434)	Fèces porcelet
<i>B. coryneforme</i> (Scardovi et Trovatelli, 1969)	C215 (=ATCC 25911, DSM 20216)	Abeille
<i>B. cuniculi</i> (Scardovi <i>et al.</i> , 1979b)	Ra 93 (=ATCC 27916, DSM 20435)	Fèces lapin
<i>B. gallinarum</i> (Watabe <i>et al.</i> , 1983)	Ch206-5 (=ATCC 33777, DSM 20670)	Fèces de poule
<i>B. indicum</i> (Scardovi et Trovatelli, 1969)	C410 (=ATCC 25912, DSM 20214)	Abeille
<i>B. magnum</i> (Scardovi et Zani, 1974)	Ra 3 (=ATCC 27540, DSM 20222)	Fèces lapin
<i>B. merycicum</i> (Biavati et Mattarelli, 1991)	Ru 915B (=ATCC 49391, DSM 6492)	Rumen de bovin
<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i> (Mitsuoka, 1969)	PNC-2-9G (=ATCC 25526, DSM 20099)	Fèces porcelet, poule, veau, rat et rumen de bovin
<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i> (Scardovi <i>et al.</i> , 1969)	Ru 224 (=ATCC 25865, DSM 20092)	Fèces porcelet, poule, lapin, veau, Rumen de bovin
<i>B. pullorum</i> (Trovatelli <i>et al.</i> 1974)	P145 (=ATCC 27685, DSM 20433)	Fèces poule
<i>B. ruminantium</i> (Biavati et Mattarelli, 1991)	Ru 687 (=ATCC 49390, DSM 6489)	Rumen de bovin
<i>B. saeculare</i> (Biavati <i>et al.</i> , 1991)	Ra 161 (=ATCC 49392, DSM 6531)	Fèces de lapin
<i>B. suis</i> (Matteuzzi <i>et al.</i> 1971)	Su 859 (=ATCC 27533, DSM 20211)	Fèces porcelet
<i>B. thermophilum</i> (Mitsuoka, 1969) syn <i>B. ruminale</i>	P2-91 (=ATCC 25525, DSM 20210)	Fèces porc, poule, veau, rumen de bovin

1-Habitat

Les bifidobactéries d'origine humaine sont retrouvées principalement dans le colon mais elles sont aussi isolées du vagin (*B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. infantis* et *B. longum*), de la cavité buccale (*B. denticolens*, *B. dentium* et *B. inopinatum*) et dans le pus d'abcès (*B. dentium*, Scardovi *et al.*, 1979a). Seule *B. dentium* semble être potentiellement pathogène.

Les bifidobactéries d'origine animale sont essentiellement isolées chez les mammifères. Trois espèces de bifidobactéries sont présentes chez les abeilles (*B. asteroides*, *B. coryneforme* et *B. indicum*), et deux, dans les fèces de poule (*B. gallinarum* et *B. pullorum*) (Tableau II, pages 28 et 29).

2-Implantation des bifidobactéries chez l'homme

Les bifidobactéries représentent une part importante de la flore intestinale de l'homme aussi bien au stade adulte qu'enfant. Les bifidobactéries apparaissent au bout de deux à cinq jours (Mitsuoka et Hayakawa, 1972) et se maintiennent tout au long de notre vie. Cette implantation varie suivant le mode de naissance, l'alimentation, l'individu et son environnement.

a-Etablissement des bifidobactéries chez le nouveau-né

Le mode de naissance :

Les enfants naissant par voie basse, sont contaminés par la flore fécale et vaginale de la mère. Les bifidobactéries sont présentes au niveau intestinal dès la première semaine (Bullen *et al.*, 1977; Mitsuoka et Hayakawa, 1972; Moreau *et al.*, 1986; Yoshioka *et al.*; 1983) et constituent la flore principale du nouveau-né (10^{10} à 10^{11} bifidobactéries par gramme de fèces).

Dans le cas d'une naissance par césarienne, l'implantation des bifidobactéries ne s'effectue qu'après deux semaines (Berzirtzoglou, 1985).

Chez les prématurés, de nombreuses équipes ont constaté une faible quantité de bifidobactéries. Par contre les bactéries appartenant au genre *Bacteroides* et les *Enterobacteriaceae* sont présentes à taux identiques à ceux d'un enfant né à terme (Goncharova *et al.*, 1979; Stark et Lee, 1982; Stevenson *et al.*, 1985).

Le lieu d'accouchement, les habitudes obstétricales et la nurserie n'ont aucune influence sur le taux de bifidobactéries et la flore des nouveau-nés (Poupard *et al.*, 1973).

L'allaitement:

L'alimentation ne semble pas affecter la flore intestinale des nouveau-nés. Mitsuoka et Kaneuchi (1977) ont démontré que le taux de bifidobactéries présentes dans la flore fécale d'enfants nourris au sein ou au lait de vache était sensiblement le même. Par contre les entérocoques et les streptocoques sont plus nombreux lors d'une alimentation artificielle (Figure 4, page 32). L'enfant allaité aura une implantation des bifidobactéries plus rapide au niveau de la muqueuse intestinale par rapport à un enfant nourri au lait maternisé. Mais après deux à trois mois, la différence s'atténue (Benno *et al.*, 1984).

De plus, la différence d'alimentation ne permet pas de favoriser une espèce de *Bifidobacterium* (*Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis* et *Bifidobacterium longum*) au dépend d'une autre (Benno *et al.*, 1984; Biavati *et al.*, 1984; Kleessen *et al.*, 1995; Neut *et al.*, 1981; Petschow et Talbott, 1991).

L'influence du lait maternel serait donc à nuancer surtout en ce qui concerne la présence de facteurs dit "bifidogènes" ayant une action sur la prolifération (Romond *et al.*, 1980).

b-Evolution des bifidobactéries chez l'Homme

Les bifidobactéries constituent une part importante de la flore colique infantile. Le taux de bifidobactéries va évoluer avec l'âge de leur hôte. Le sevrage s'accompagne d'une légère diminution des bifidobactéries et d'une augmentation des entérobactéries et des genres *Bacteroides* et *Clostridium* (Stark et Lee, 1982; Benno *et al.*, 1984). Après 65 ans, les bifidobactéries voient leur taux diminuer au profit des *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Escherichia coli* et *Streptococcus* (Figure 5, page 34). Le genre *Bifidobacterium* passe donc de genre majoritaire chez le nourrisson au deuxième ou troisième genre chez l'adulte.

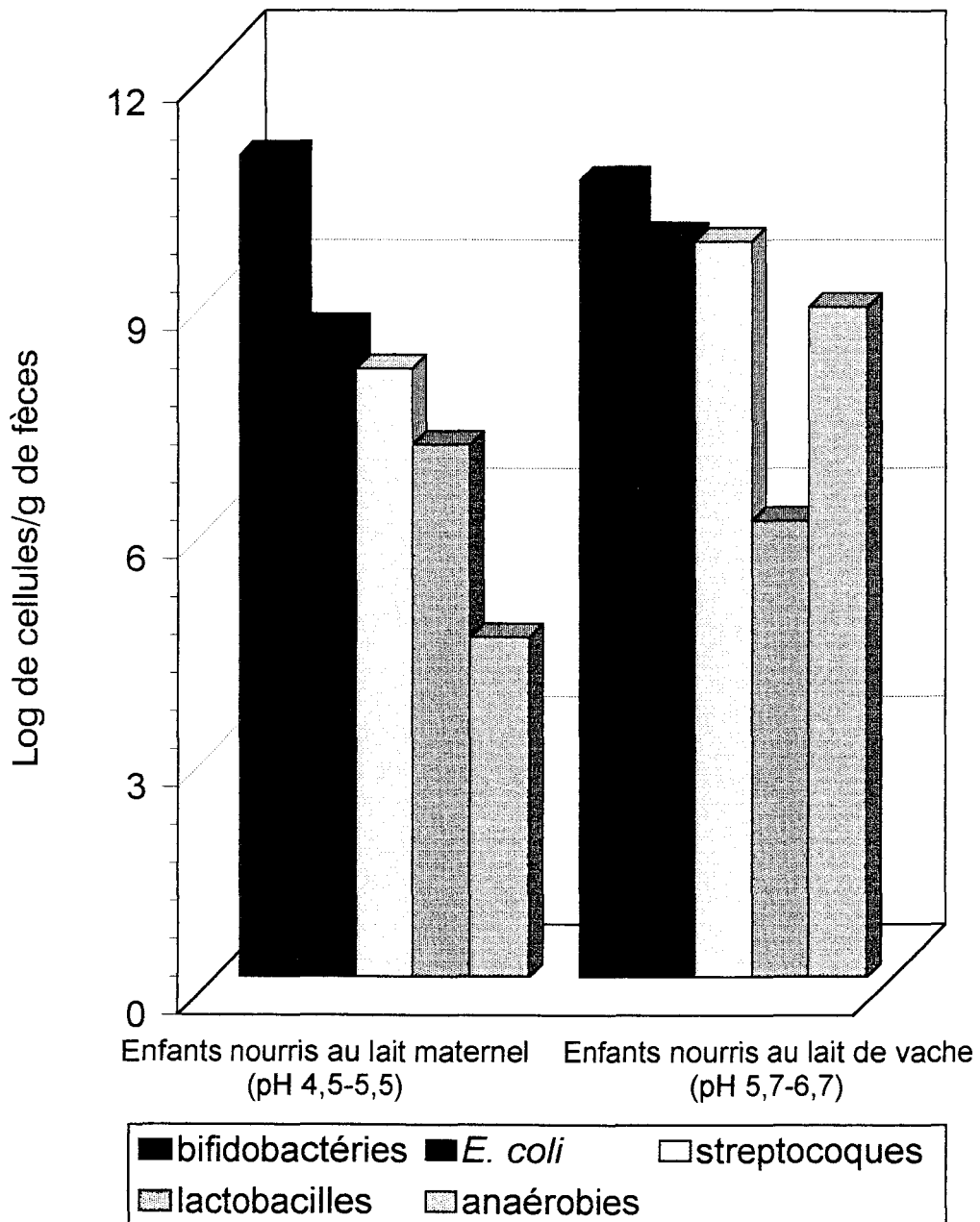


Figure 4 : Influence du type d'allaitement sur la composition de la flore du nourrisson selon Mitsuoka et Kaneuchi, 1977.

De plus, les espèces de bifidobactéries vont changer suivant l'âge de leur hôte (Biavati *et al.*, 1984). Les nourrissons possèdent plus particulièrement les espèces *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis* et *Bifidobacterium longum*. Après le sevrage, on retrouve majoritairement les espèces *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium longum* et *Bifidobacterium pseudocatenulatum* (Tableau III, page 34).

L'équilibre de la flore intestinale est très instable. Le stress, le changement brusque d'alimentation ou l'absorption d'antibiotique provoque un dérèglement au niveau de la flore intestinale avec élimination de certaines espèces (Lugoskaia et Ladodo, 1984).

C-Milieux de culture

Les bifidobactéries sont des bactéries exigeantes du point de vue des nutriments. De nombreuses équipes ont mis au point différents milieux de culture afin d'obtenir une croissance optimale de ces bactéries anaérobies. Les différents besoins nutritifs du genre *Bifidobacterium* vont être analysés dans cette troisième partie.

1-Besoins azotés

Les bifidobactéries sont capables d'utiliser les sels d'ammonium comme seule source d'azote (Hassinen *et al.*, 1951), à l'exception des espèces, *Bifidobacterium choerinum*, *Bifidobacterium cuniculi*, *Bifidobacterium magnum* et *Bifidobacterium suis* qui ont besoin d'azote organique pour leur croissance (Matteuzzi *et al.*, 1978; Ballongue, 1993). Les espèces ne nécessitant pas d'azote organique pour leur croissance excrètent une quantité considérable d'acides aminés, et plus particulièrement de l'acide aspartique, de l'alanine et de la valine (Matteuzzi *et al.*, 1978).

2-Besoins minéraux

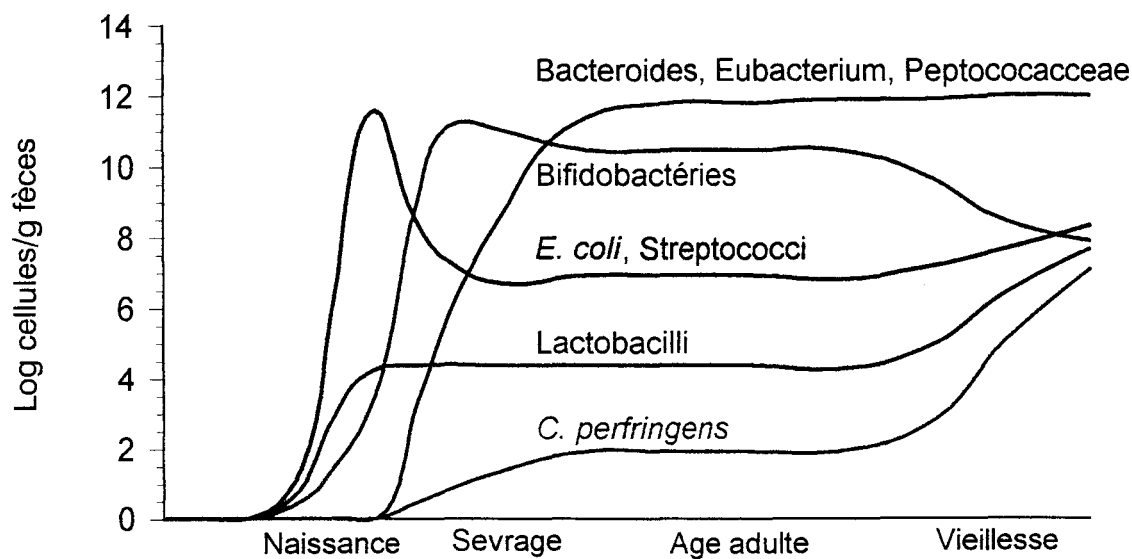


Figure 5 : Différences entre les populations bactériennes retrouvées dans les fèces, en fonction de l'âge (Mitsuoka et Hayakawa, 1972).

Tableau III : Evolution de la fréquence des espèces de *Bifidobacterium* en fonction des différents groupes d'âge (en pourcentage de bactéries isolées de la flore fécale par rapport au nombre de bifidobactéries isolées) selon les données de Biavati *et al.* (1984; 1986).

Espèces	Nourrissons allaitement maternel ^a	Nourrissons allaitement artificiel ^a	Adultes ^b
<i>B. adolescentis</i>			20
<i>B. bifidum</i>	8,8	4	7,5
<i>B. breve</i>	26,2	28	
<i>B. catenulatum</i>	3,3	4	12,5
<i>B. dentium</i>	3		
<i>B. infantis</i>	29,5	32	
<i>B. longum</i>	19,7	20	17,5
<i>B. pseudocatenulatum</i>	6,6	12	42,5

^a test d'hybridation ADN-ADN

^b test d'électrophorèse en gel de polyacrylamidedes protéines solubles

Les milieux synthétiques ou semi-synthétiques utilisés pour la croissance des bifidobactéries, comprennent en général du magnésium (Mg^{2+}), du calcium (Ca^{2+}), du zinc (Zn^{2+}), du manganèse (Mn^{2+}) et du fer (Fe^{2+} et Fe^{3+}). Il semblerait que seul ce dernier soit réellement important pour la croissance des bifidobactéries (Bezkorovainy et Topouzian, 1983).

L'utilisation du fer par les bifidobactéries a été étudiée, car le fer joue un rôle important dans les mécanismes de protections vis-à-vis des infections bactériennes. La présence de fer au niveau intestinal augmente la virulence des bactéries pathogènes. Les bifidobactéries incorporent le fer et le rendent donc inaccessible aux bactéries pathogènes. Les bifidobactéries sont capables d'assimiler aussi bien le fer ferrique à pH neutre (Ueda *et al.*, 1983; Bezkorovainy *et al.*, 1986) que le fer ferreux à pH acide (Topouzian et Bezkorovainy, 1986; Bezkorovainy *et al.*, 1988) via une ATPase membranaire. Par ce mécanisme d'assimilation, elle pourrait contribuer à jouer un effet de barrière vis-à-vis des bactéries pathogènes par ferriprivation.

3-Besoins vitaminiques

La présence de vitamines dans le milieu de culture n'est pas indispensable à la croissance des bifidobactéries. Les seules vitamines requises pour la croissance des bifidobactéries, sont le panthoténate et pour certaines espèces la riboflavine et la biotine (Bezkorovainy, 1989).

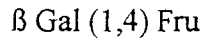
Par contre, certaines espèces sont capables de biosynthétiser de nombreuses vitamines, comme la biotine (Noda *et al.*, 1994), la thiamine, l'acide nicotinique, l'acide folique et la vitamine B12 (Degushi *et al.*, 1985). Ces molécules sont excrétées dans le milieu de culture.

4-Les "facteurs bifidogènes"

Les "facteurs bifidogènes" (ou bifidigènes) sont des molécules qui favorisent la croissance des bifidobactéries. Seuls les "facteurs bifidogènes" de *Bifidobacterium bifidum* ont été étudiés et sont bien connus.

a-Facteur de Petuely

Le "facteur bifidogène" découvert par Petuely (Petuely et Kristen, 1949; 1951), n'est autre que le lactulose. Le lactulose est un disaccharide formé par un galactose et un fructose:



Le lactulose résulte du traitement thermique du lactose. Cette structure n'est pas bien reconnue par la lactase de l'intestin grêle (Hoffman *et al.*, 1964) et arrive au niveau du colon, où, elle peut servir de nutriment pour les micro-organismes. Ainsi lors d'une supplémentation du lait par le lactulose, on note une augmentation du taux de bifidobactéries. On ne peut pas parler de véritable facteur "bifidogène" car cette molécule, active uniquement *in vivo*, permet aussi d'augmenter le taux d'*Escherichia coli* (Yoshika, 1971). Les produits d'hydrogénation (lactite, lactulite) sont aussi des facteurs "bifidogènes" (Petuely, 1966).

b-Facteur BF1

Le facteur "bifidogène" BF1 ou gynolactose (Polonovski et Lespagnol, 1930) est composé d'un ensemble d'oligosaccharides, caractéristiques du lait de femme et de certaines sécrétions (György *et al.*, 1954a). Ces oligosaccharides sont présents, mais en moindre quantité, dans le lait d'un grand nombre de mammifères tels que la vache, la brebis, la chèvre et la jument (György *et al.*, 1954b). Les oligosaccharides du lait sont classés en deux groupes, les oligosaccharides neutres (Kühn et Baer, 1956; Montreuil, 1956; Grimmonprez et Montreuil, 1968) et les oligosaccharides acides (Kühn, 1958; Grimmonprez et Montreuil, 1968). Seuls les oligosaccharides contenant de la N-acétylglucosamine possèdent une activité "bifidogène" (Gauhe *et al.*; 1954, György et Rose, 1955). Cette activité est proportionnelle au nombre de résidus de N-acétylglucosamine contenu dans l'oligosaccharide (von Nicolai et Zilliken, 1972).

;

c-Facteur BF2

Le facteur "bifidogène" BF2 est un protéolysat spécifique de la caséine bovine (György et Rose, 1955). Le mélange est obtenu après hydrolyse trypsique, pancréatique ou

papaïnique (Rose et György, 1963; Raynaud et Bizzini, 1971). Le facteur BF2 est actif aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* (Raynaud *et al.*, 1959). Une hydrolyse acide totale rend l'hydrolysate de caséine totalement inactif (Seka Assi, 1982).

d-Les protéines

Les glycoprotéines du colostrum et du lait humain ou du colostrum de vache sont des facteurs "bifidogènes". Hirano et son équipe (1968) isolent à partir du colostrum humain, huit fractions contenant des glycopeptides augmentant la croissance des bifidobactéries, alors que deux seulement sont isolées du colostrum de vache (Nichols *et al.*, 1974).

Si la caséine bovine favorise aussi la croissance des bifidobactéries (Bezkorovainy *et al.*, 1979) lorsqu'elle est prédigérée par des enzymes protéolytiques (BF2), la caséine humaine native semble être "bifidogène" sous sa forme native (Bezkorovainy *et al.*, 1981), à moins qu'elle ne soit mieux dégradée que caséine bovine par les enzymes du tractus digestif.

e-Les oligosaccharides

De nombreux oligosaccharides ont été étudiés pour leur capacité à favoriser la croissance des bifidobactéries. Yazawa et collaborateurs démontrent en 1978 que le raffinose, le stachyose ou encore l'inuline sont utilisés par de nombreuses espèces de bifidobactéries.

Les fructo-oligosaccharides (FOS), polymère de fructose sont classés aussi dans les facteurs "bifidogènes" (McKellar et Modler, 1989; Wang et Gibson, 1993).

D'autres oligosaccharides synthétiques ou bactériens ont aussi été testés pour leur effet bénéfique sur la flore "bifide". Les bifidobactéries sont capables d'utiliser des produits de transgalactosylation (TOS) (Tanaka *et al.*, 1983; Smart, 1993; Ito *et al.*, 1993; Rowland et Tanaka, 1993), le galactosucrose et le lactosucrose (Minami *et al.*, 1983). Les gluco-oligosaccharides (GOS) sont des polysaccharides de glucose lié en $\alpha(1,2)$ et $\alpha(1,6)$. Ils sont dégradés par les bifidobactéries, mais aussi par d'autres genres bactériens comme *Bacteroides*. Les GOS sont moins efficaces que les TOS ou les FOS pour le développement des bifidobactéries (Djouzi, 1994).

f-Conclusion

Les facteurs "bifidogènes" peuvent être classés en deux grands groupes, les oligosaccharides et les hydrolysats de protéines.

Les oligosaccharides du lait de femme, les galactooligosaccharides ou encore les fructo-oligosaccharides sont accessibles comme nutriments pour les bactéries au niveau intestinal. En effet, elles possèdent un grand nombre de glycosidases (cf page 38) qui peuvent hydrolyser les oligosaccharides se présentant à elles. Les oligosaccharides du lait de femme sont constitués d'enchaînement de galactose, de N-acétylglucosamine et de glucose substitué par du fucose ou des acides sialiques. La souche *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082 exprime à sa surface les activités galactosidasiques, N-acétylglucosaminidasique, fucosidasiques et sialidasiques. Elles coupent les différents oligosaccharides et incorporent les saccharides ainsi obtenus. Ces enzymes sont aussi efficaces sur les structures saccharidiques des mucines intestinales. Les saccharides ainsi incorporés servent à fournir de l'énergie et à biosynthétiser les macromolécules indispensables à la croissance bactérienne.

Les hydrolysats de protéines permettent aux bifidobactéries d'utiliser les acides aminés qui leur sont nécessaires pour leur croissance.

Depuis quelques années, la nécessité des facteurs "bifidogènes" pour la croissance des bifidobactéries, est remise en cause. Ils ne semblent pas aussi indispensables que ne le suggère leur nom. Il est en effet possible d'obtenir une croissance des bifidobactéries sans la présence de ces facteurs. Ils ne sont donc pas des facteurs de croissance. Un facteur de croissance est une molécule indispensable à la bactérie, et qu'elle ne peut synthétiser. Les facteurs "bifidogènes" que nous avons décrits ici, ne sont en aucun cas des facteurs de croissance.

5-Glycosidases et métabolisme des saccharides

a-Glycosidases

Les bifidobactéries sont capables de dégrader de nombreuses structures saccharidiques (Crociani *et al.*, 1994) car elles possèdent les glycosidases indispensables pour réaliser ce travail. On peut caractériser les enzymes suivantes :

- β -D-galactosidase (von Nicolai et Zilliken, 1984; Tochikura *et al.*, 1986; Passerat et Desmaison, 1995; Degnan et Macfarlane, 1995)

- α -D-galactosidase (Sakai *et al.* 1987a; Garro *et al.*, 1994)

- β -D-glucosidase (Sakai *et al.*, 1986; 1987b; Choi *et al.*, 1996; Akao *et al.*, 1994)

- α -D-glucosidase (Degnan et Macfarlane, 1994)

- β -fructofuranosidase (Muramatsu *et al.*, 1993; 1994; Imamura *et al.*, 1994)

- β -glucuronidase (Hawksworth *et al.*, 1971)

-N-acétyl-D-glucosaminidase (Desjardins *et al.*, 1990)

- α -L-arabinopyranosidase (Degnan et Macfarlane, 1995)

-arabinogalactanase (Degnan et Macfarlane, 1995)

- α -D-neuraminidase (von Nicolai et Zilliken, 1972; von Nicolai *et al.*, 1981)

L'ensemble de ces enzymes ne s'exprime pas chez toutes les espèces. Elles peuvent être inductibles comme l'arabinogalactanase que l'on détecte uniquement lors d'une croissance en présence d'arabinogalactane (Degnan et Macfarlane, 1995).

Parmi les bifidobactéries, seule l'espèce *Bifidobacterium bifidum* présente une activité positive sur les mucines (Crociani *et al.*, 1994). La souche *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082 est capable de dégrader les mucines gastriques et intestinales à l'aide des glycosidases, neuraminidases, N-acétylhexosaminidases, galactosidases, endoglycosidases.

b-Métabolisme des saccharides

Après hydrolyse des structures saccharidiques par les glycosidases, les monosaccharides libérés sont dégradés dans les bifidobactéries grâce à la voie de la fructose-6-phosphate phosphocétolase appelée couramment "shunt bifide" (Scardovi et Trovatielli, 1965, De Vries *et al.*, 1967).

-Le "shunt bifide"

La glucose-6-phosphate déshydrogénase et l'aldolase sont absentes chez la majeure partie des bifidobactéries (De Vries et Stouthamer, 1967), on peut cependant les détecter à un niveau très faible chez quelques espèces (Scardovi et Sgorbati, 1974, Scardovi, 1986; Biavati *et al.*, 1992a). Ces deux dernières enzymes sont respectivement, les enzymes clés

de la voie des hexoses monophosphates et de la voie de la glycolyse. Le glucose pour être dégradé doit donc emprunter une nouvelle voie, la voie de la fructose-6-phosphate phosphocétolase qui en est l'enzyme clé (Figure 6, page 41). Le "shunt bifide" est aussi caractérisé par la présence de la transaldolase et de la transcétolase. La transaldolase et la transcétolase fonctionnent en sens inverse par rapport à la voie des hexoses monophosphates. L'ensemble des enzymes présentes dans le "shunt Bifide" a été caractérisé chez toutes les bifidobactéries.

La fermentation de deux moles de molécule de glucose conduit à la formation de deux moles de molécule de lactate et trois d'acétate si le pyruvate est converti en lactate par la Lactate déshydrogénase. Cette voie de dégradation ne produit pas de gaz carbonique. Du point de vue énergétique, elle conduit à la formation de 2,5 moles de molécule d'ATP par mole de molécule de glucose.

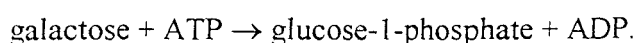
Cependant, certaines souches produisent plus d'acétate et moins de lactate avec apparition d'autres métabolites. Le pyruvate n'est pas toujours converti en lactate mais en formiate, acétate et éthanol (Figure 7, page 42). Cette voie de conversion permet de former à partir de deux moles de molécule de pyruvate, deux moles de molécule de formiate, une mole de molécule d'acétate et une mole de molécule d'éthanol (De Vries et Stouthamer, 1968; Lauer et Kandler, 1976).

Le pyruvate subit une décarboxylation pour donner deux molécules d'acétyl-Coenzyme A et une molécule de formiate *via* la voie thioclastique (Doelle, 1969). Ensuite, les 2 molécules d'acétyl-Coenzyme A sont converties en acétate par l'acétate kinase en libérant une mole de molécule d'ATP ou en éthanol par une déshydrogénase. Cette variation des métabolites dépend de l'espèce, du milieu de culture, du temps de culture et de la nature du glucide (De Vries et Stouthamer, 1968).

-Fermentation des autres saccharides

Le fructose pénètre directement dans le "shunt bifide" *via* la fructokinase et le fructose-6-phosphate (Figure 6, page 41).

Le galactose peut emprunter deux voies, la voie de Leloir et la voie dite de la pyrophosphorylase (Figure 8, page 43). Ces deux voies possèdent le même bilan réactionnel:



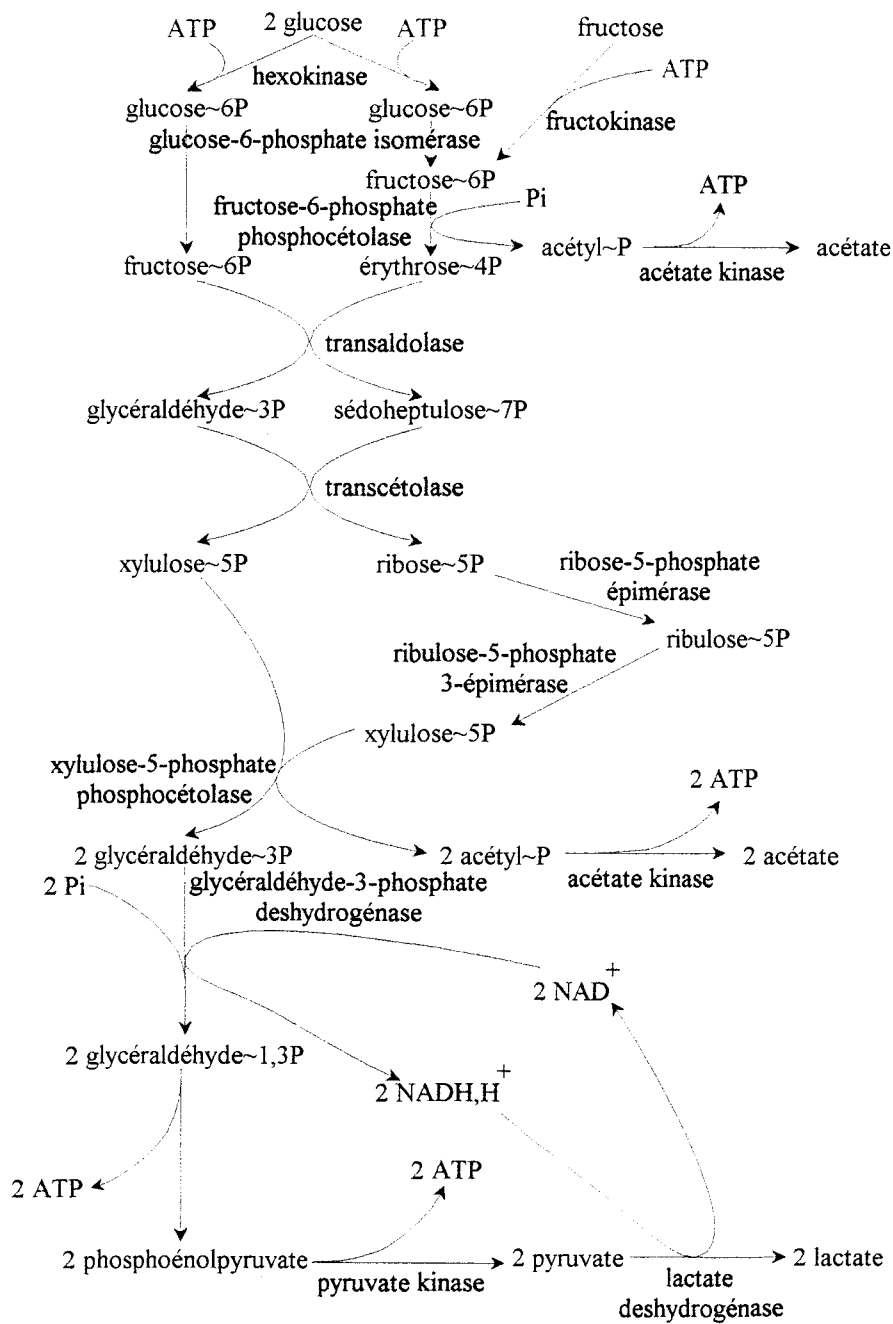


Figure 6 : Voie de dégradation des monosaccharides chez les bifidobactéries (SHUNT BIFIDE)

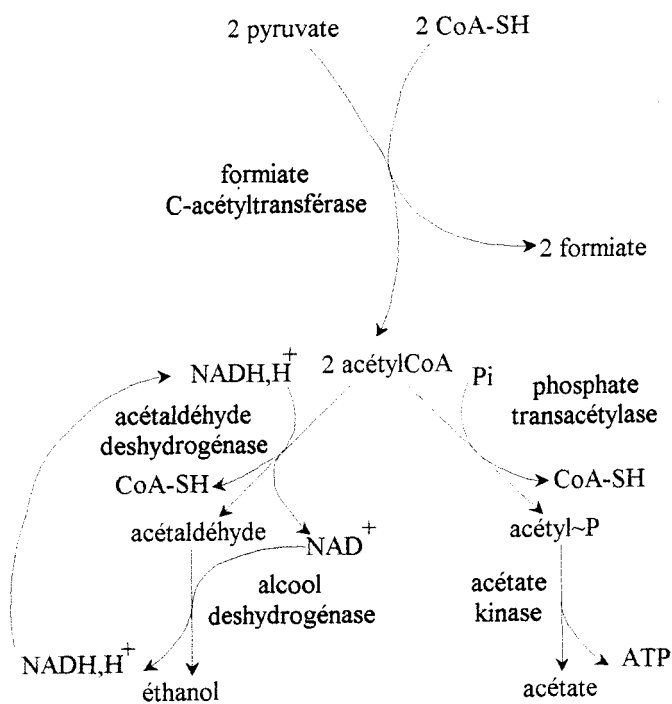


Figure 7 : Voie alternative de la dégradation du pyruvate

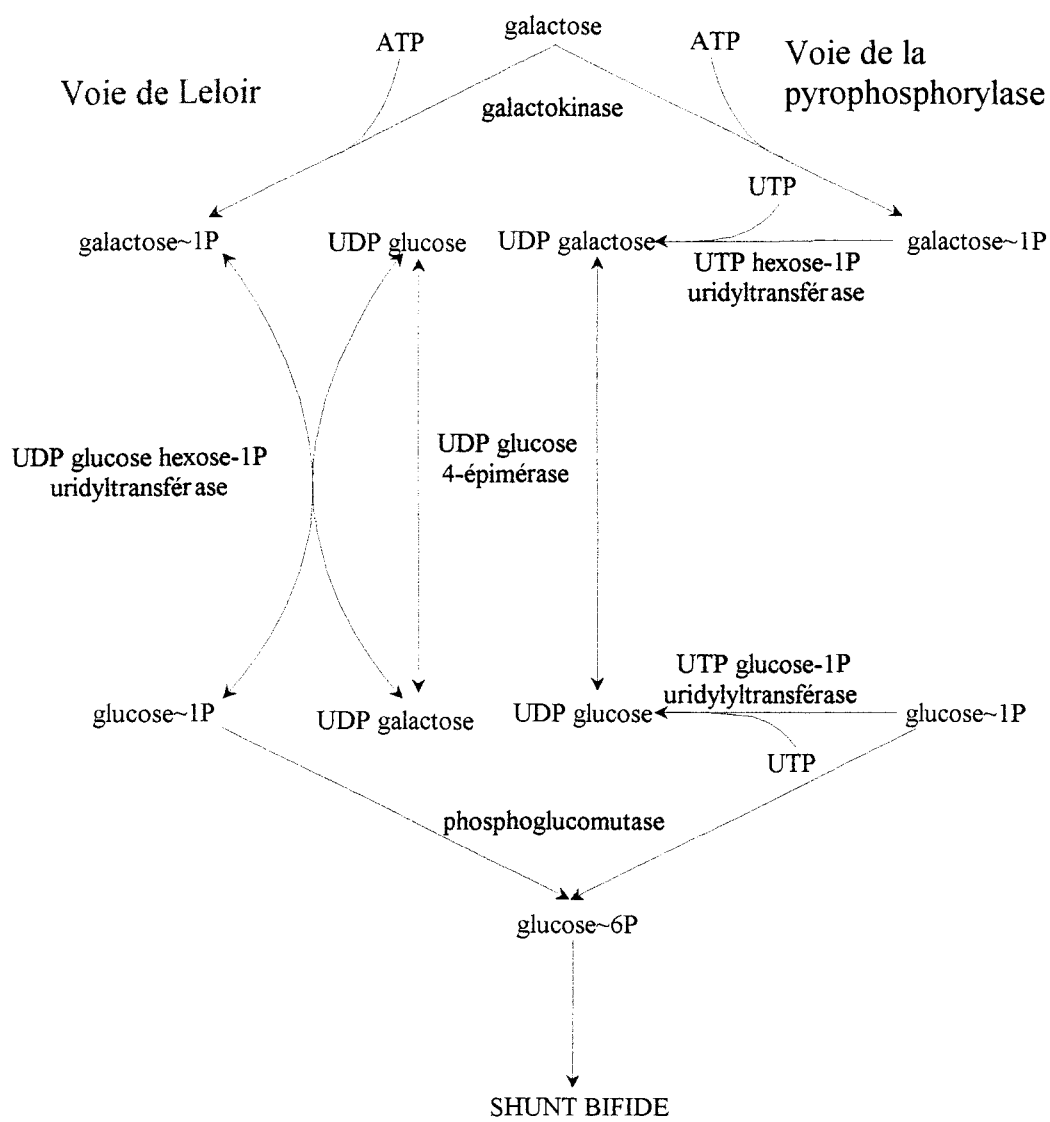


Figure 8 : Les différentes voies de conversion du galactose en glucose-6-phosphate.

La première étape est commune aux deux voies, le galactose est phosphorylé par la galactokinase (Lee *et al.*, 1977; 1980a).

La voie de Leloir convertit le galactose-1-phosphate en glucose-1-phosphate *via* l'UDP glucose hexose-1-P uridyltransférase en présence d'UDP glucose.

La voie de la pyrophosphorylase permet de former du glucose-1-phosphate *via* l'UDP galactose et l'UDP glucose à partir du galactose-1-phosphate (Lee *et al.*, 1978; 1980b).

La N-acétylglucosamine est convertie en fructose-6-phosphate pour rejoindre le "shunt bifide" (Veerkamp, 1969a; 1969b). Cette conversion est très rapide, il y a en premier lieu, phosphorylation de la N-acétylglucosamine, puis désacétylation et enfin désamination (Figure 9, page 45). L'activité D-glucosamine-6-phosphate synthétase est très faible, indiquant que la synthèse endogène de la N-acétylglucosamine est limitée.

D-Les bifidobactéries : pathogénicité et effets probiotiques

1-Pathogénicité

Une seule espèce est reconnue comme potentiellement pathogène pour l'homme, il s'agit de *Bifidobacterium dentium*. Cette espèce serait un pathogène opportuniste.

Des infections à *Bifidobacterium bifidum* ont été mises en évidence au niveau des poumons et au niveau anal (Beerens et Tahon-Castel, 1965) ou par *Bifidobacterium adolescentis* dans le conduit urinaire (Guillard *et al.*, 1980). Mais une certaine prudence est de mise sur les techniques d'identification de l'espèce car il est difficile de différencier l'espèce *Bifidobacterium adolescentis* et *Bifidobacterium dentium*. Récemment, Nakazawa et son équipe ont décrit dans le cas d'une méningite, la présence de *Bifidobacterium breve*. La caractérisation et l'identification ont été réalisées par hybridation ADN-ADN (Nakazawa *et al.*, 1996).

Des infections dues à *Bifidobacterium dentium* ont été détectées au niveau de la plaque dentaire (Gallagher *et al.*, 1984), dans le pus des otites chroniques ou aiguës (Brook, 1984) ainsi que dans les cas de sinusite chronique (Finegold, 1977). Dans tous les

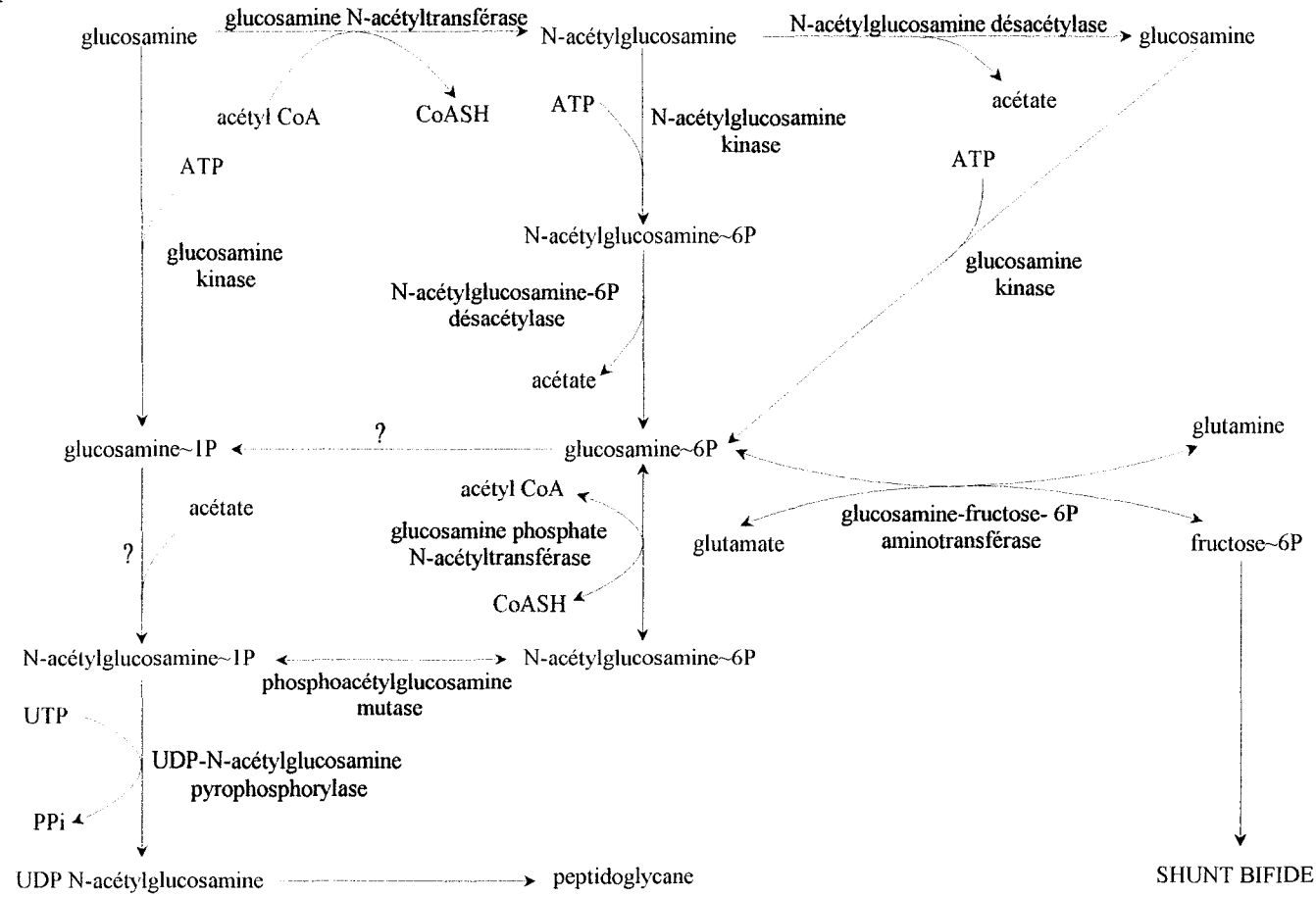


Figure 9 : La voie métabolique de la N-acétylglucosamine adaptée de Veerkamp *et al.*, 1969.

cas, il semble que la cible préférentielle soit la sphère buccale. Si les bifidobactéries sont impliquées dans certaines infections, il faut minimiser leur importance comme pathogène potentiel, en effet on ne rencontre ces germes que dans 1% des infections (Brook, 1984), en plus, ce ne sont pas les germes dominants (Finegold, 1977).

Au niveau pulmonaire, *Bifidobacterium dentium* peut pénétrer par inspiration, mais de telles infections sont assez rares. En général, les patients atteints d'infections où l'on caractérise *Bifidobacterium dentium*, sont prédisposés, ils sont soit diabétiques (Miller-Catchpole, 1989), alcooliques (Green, 1978) ou soumis à des bronchites chroniques (Thomas *et al.*, 1974).

Les infections au niveau intestinal, s'accompagnent toujours d'une perforation de la paroi épithéliale avec formation d'abcès (Wilson *et al.*, 1972). Cette infection est toujours polymicrobienne. De même, dans des cas d'appendicite aiguë, 3% des infections du fluide péritonéal sont dues à des bifidobactéries non identifiées (Stone *et al.*, 1975).

Les infections dues à des bifidobactéries du conduit urinaire et du conduit génital de la femme sont rarissimes (Sapico *et al.*, 1976; Miller-Catchpole, 1989). Tous les patients atteints au niveau urinaire, avaient subi des dilatations du conduit urinaire par cathéter.

Toutes ces infections doivent être ramenées à leur juste valeur, en effet, dans tous les cas les bifidobactéries ne sont pas les bactéries dominantes ou l'agent direct de l'infection. Il s'agit de bactéries opportunistes.

2-Rôle et utilisation des bifidobactéries

a-Rôle des bifidobactéries

Les bifidobactéries pourraient influencer l'état de santé de leur hôte. L'action des bifidobactéries a surtout été étudiée chez les nourrissons.

La colonisation de l'intestin par des bifidobactéries empêcherait la fixation et le développement des bactéries pathogènes et putréfiantes par compétition au niveau des sites de fixation à la surface épithéliale et au niveau des nutriments. *Clostridium perfringens* ne

se maintient pas chez les nouveau-nés en présence de *Bifidobacterium bifidum* (Berzirtzoglou, 1985).

Les bifidobactéries produisent de l'acide lactique et acétique (baisse du pH intestinal), détruisent les sites de reconnaissance des bactéries par hydrolyse des mucines intestinales, et peuvent lyser la paroi des bactéries à Gram positif à l'aide de substances antibactériennes (lysozyme-like; Minagawa et Okada, 1974; Gibson et Wang, 1994). L'ensemble de ces actions, appelé "effet de barrière", permettrait de réguler la flore intestinale et d'éviter la prolifération de germes pathogènes (Poupard *et al.*, 1973; Yamazaky *et al.*, 1982, Tamura, 1983).

Les bifidobactéries tendraient à régulariser le taux sanguin de cholestérol et à baisser le taux d'ammoniac, de phénols libres, des indols et des amines (détoxification). Elles pourraient diminuer la quantité de molécules cancérogènes et activeraient le système immunitaire.

Pour l'ensemble de ces actions, les bifidobactéries peuvent être utilisées comme probiotiques mais bon nombre de ces allégations nutritionnelles restent encore à vérifier.

b-Utilisation des bifidobactéries comme bactéries probiotiques

Les bactéries probiotiques selon la définition de Fuller (1992) sont des bactéries vivantes qui ingérées, ont un effet bénéfique sur leur hôte en améliorant l'équilibre de la flore intestinale.

Certaines souches de bifidobactéries résistent à l'acidité gastrique et elles se retrouveraient vivantes au niveau intestinal à un taux compris entre 25 et 40% (Berrada, *et al.*, 1989; Biavati *et al.*, 1992b; Bouhnik *et al.*, 1992; Marteau *et al.*, 1992; Pochart *et al.*, 1992).

Les bifidobactéries pourraient agir, pour le bien-être de leur hôte, à plusieurs niveaux:

- par un apport nutritionnel

Les bifidobactéries synthétisent des vitamines B et K (Degushi *et al.*, 1985; Noda *et al.*, 1994), des acides aminés, acide aspartique, alanine, thréonine et valine (Matteuzzi *et*

al. 1978; Teragushi *et al.*, 1986), et de l'acide lactique assimilable. De plus elles permettent une assimilation accrue des nutriments lipidiques par une acidification de la lumière intestinale et une prédigestion des protéines et du lactose (Hove *et al.*, 1994).

- par une action au niveau de la flore et du transit intestinal

L'ingestion de bifidobactéries vivantes exogènes augmenterait le taux de bifidobactéries dans le tractus intestinal (Benno et Mitsuoka, 1992; Bouhnik *et al.*, 1992; Ballongue *et al.*, 1993) et inhiberait la prolifération de certaines entérobactéries (Faure *et al.*, 1982). Ces résultats sont assez contradictoires. Pour Bounhik (1993), les bifidobactéries ne peuvent pas s'implanter au niveau intestinal, alors que Ballongue et collaborateurs (1993) annoncent une implantation de leur souche. Dans les deux cas, l'augmentation des bifidobactéries n'est valable que pendant la période d'ingestion du lait fermenté.

La prise de bifidobactéries aurait un effet préventif ou curatif sur les diarrhées (Kurman et Rasic, 1991; Ballongue, 1993) et un effet sur le transit intestinal qui serait facilité (Ballongue, 1993).

Chez les patients atteints de leucémie, la prise de bifidobactéries permettrait une stabilisation de la flore intestinale (Kageyama *et al.*, 1984).

- action hypocholestérolémiant

Les bifidobactéries ingérées entraîneraient une diminution du taux de cholestérol plasmatique (Homma, 1988; Tahri *et al.*, 1995; 1996). L'action des bifidobactéries sur le taux de cholestérol n'a jamais été clairement démontrée.

-action anti-tumorale

L'administration de bifidobactéries chez des souris diminue la fréquence d'apparition de cancer (Kohwi *et al.*, 1978; Mitzutani et Mitsuoka, 1979; Perdigon *et al.*, 1989). Les bifidobactéries diminueraient ou inhiberaient l'activité de la β -glucuronidase intestinale des rats (Godelle *et al.*, 1985; Kulkarni et Reddy, 1994). *Bifidobacterium longum* possède un effet inhibiteur sur le développement des tumeurs du foie, de la glande mammaire et du colon induit par des dérivés de la quinoline (Reddy et Rivenson, 1993).

Selon Sekine et son équipe, le peptidoglycane de *Bifidobacterium infantis* posséderait une activité anti-tumorale (Sekine *et al.*, 1985; 1994b; 1994c; 1995).

-stimulation des défenses immunitaires

La prise de bifidobactéries par voie orale stimulerait la production d'anticorps contre les micro-organismes pathogènes et les allergènes (Lay et Fields, 1981; Yasui et Ohwaki, 1991). Fujiwara et son équipe (1990) ont testé 23 souches, une seule serait capable de stimuler le système immunitaire. Mais en 1993, Lee et collaborateurs (1993) démontrent que *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium longum* et *Bifidobacterium infantis* possèdent une activité immunorégulatrice importante. De plus, les bifidobactéries seraient capables de stimuler la production d'interleukine (Sekine, 1994a).

Quelques résultats expérimentaux sont résumés dans le Tableau IV, page 50. Tous ces résultats restent cependant à confirmer par des études sur des lots de cobayes plus importants de manière à pouvoir travailler en double-aveugle. Les conditions expérimentales devront être mieux définies (âge des cobayes, identification des souches ...), ceci permettrait de connaître les réels effets des bifidobactéries sur leur hôte.

c-Autres utilisations des bifidobactéries

Les bifidobactéries sont utilisées comme marqueurs de pollution de l'eau. Elles sont capables de survivre dans l'eau comparativement aux autres marqueurs tels que *Escherichia coli*, ou les coliformes fécaux (Resnick et Levin, 1981; Mara et Oragui, 1983). A l'exception de *Bifidobacterium minimum* et *Bifidobacterium subtile* isolées d'eaux usées, les autres espèces sont spécifiques, soit de l'homme, soit des animaux. L'étude de la contamination de l'eau par les bifidobactéries, permet de pouvoir déterminer l'origine de la "pollution" (Gavini *et al.*, 1991).

II-TRANSPORTS MEMBRANAIRES DES SACCHARIDES

Tableau IV : Propriétés biologiques exprimées par les bifidobactéries.

(H. Symons, 1994, Les Bifidobactéries, World Newsletter Danone n°3)

Organisme	Forme	Contrôle	Test	Effets
<i>B. bifidum</i> et <i>L. acidophilus</i>	lyophilisée	placebo	<i>in vivo</i> (15 personnes)	↘ inflammation chronique du côlon sigmoïde* ↗ immunité humorale*
<i>B. breve</i> 4064		<i>B. breve</i> Ka-6	<i>in vivo</i>	↗ IgA sécrétoires
<i>B. breve</i> 4064	suspension aqueuse (tube stomacal)	<i>B. breve</i> Ka-6	<i>in vivo</i> (souris)	↗ anticorps spécifique-antigène* (toxine du choléra)
<i>B. longum</i>	lait fermenté	yoghourt	<i>in vivo</i> (10 personnes)	↘ effets gastro-intestinaux induits par l'érythromycine
<i>B. longum</i> BL2928	cellules tuées à la chaleur, lyophilisées	latex	<i>in vitro</i> phagocytose	↗ production d'IL-1 ↗ cytotoxicité
<i>B. longum</i>	bactéries lyophilisées	mêmes personnes avant et après bifidus	<i>in vivo</i> (5 personnes)	↘ population de clostridies ↘ NH ₃ dans les fèces ↘ β-glucuronidase dans les fèces ↘ pH dans les fèces
<i>B. longum</i> BB536	lait fermenté	<i>B. longum</i> ATCC 15707	<i>in vivo</i> (48 personnes)	↘ population de clostridies, bactéroïdes et coliformes
<i>B. longum</i>	lait fermenté	lait écrémé, yoghurt	<i>in vivo</i> (souris)	↗ durée de vie* ↘ créatinine*
<i>Bifidobacterium</i> spp.	?	-	<i>in vivo</i> (15 personnes)	↘ fréquence des selles dans la diarrhée persistante
<i>Bifidobacterium</i> spp.	lait fermenté	mêmes personnes avant et après bifidus	<i>in vivo</i> (Homme)	↗ fréquence des selles (chez des personnes âgées alitées)
<i>Bifidobacterium</i> spp.	lait fermenté	lait fermenté au bifidus pasteurisé	<i>in vivo</i> (60 personnes)	↘ temps de transit colonique*
<i>Bifidobacterium</i> spp. et <i>L. acidophilus</i>	lait fermenté	mêmes personnes avant et après bifidus	<i>in vivo</i> (6 personnes)	↘ nitroréductase ↘ glucuronidase

*Différence statistiquement significative entre le groupe traité et le groupe contrôle.

↘ diminution

↗ augmentation

Les bactéries ont besoin de divers nutriments pour leur croissance et la production d'énergie. Pour utiliser les différents nutriments qu'elles ont à leur disposition dans leur habitat, elles doivent être capables de les dégrader ou de les assimiler. La première étape est la capacité de la bactérie à absorber les nutriments. Pour cela, les micro-organismes possèdent de nombreux moyens pour transporter les différentes molécules nécessaires à leur développement.

A-Les différents types de transport chez les procaryotes

1-Diffusion

a-Diffusion passive

La diffusion passive ou diffusion simple, n'est que peu usitée chez les micro-organismes. Un gradient s'établit entre la concentration la plus élevée et la plus faible. La bactérie se sert de ce gradient pour faire pénétrer la molécule (Figure 10, page 52). La vitesse de pénétration de la substance est proportionnelle à la concentration de la molécule. Pour être efficace, la concentration du nutriment doit être très élevée à l'extérieur. La diffusion simple est un mode de pénétration non spécifique des substances. Les nutriments, *in vivo*, sont souvent en faible quantité, ce mécanisme est donc peu efficace pour les bactéries.

b-Diffusion facilitée

La diffusion facilitée combine la diffusion passive et l'action de protéines membranaires de transport appelée couramment perméase. La pénétration du substrat est médiée par les protéines du transporteur (Figure 10, page 52). Ce type de transport est saturable et spécifique de la molécule qu'il véhicule. La diffusion facilitée ne nécessite pas d'apport d'énergie, de plus, la vitesse d'incorporation est dépendante de la concentration externe du soluté. L'incorporation du soluté s'arrête dès que le gradient entre les deux compartiments disparaît.

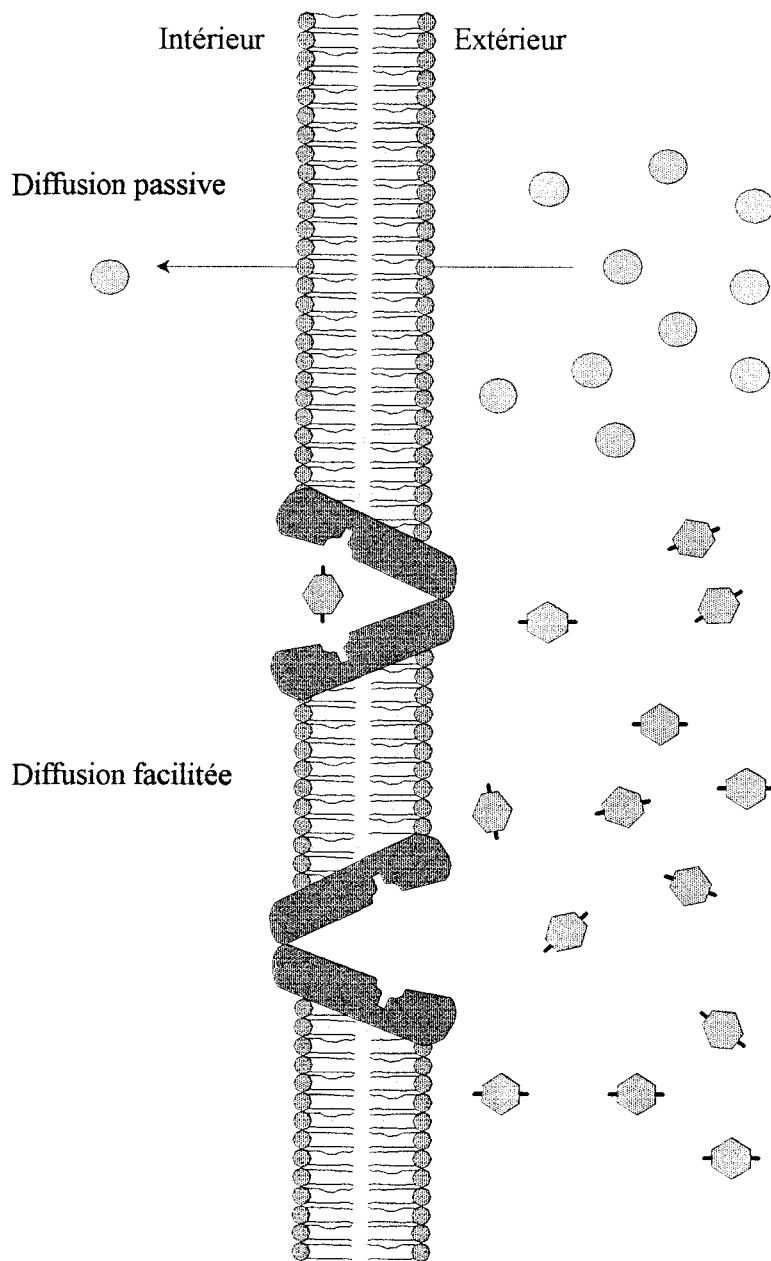


Figure 10 : Représentation schématique des différents types de transport par diffusion

Si la concentration interne du soluté est supérieure à la concentration extracellulaire, le sens du transport est inversé.

Ce mécanisme est plus efficace que la diffusion passive, surtout pour des concentrations faibles en substrat. Le glycérol est transporté par ce système chez toutes les bactéries (Dills *et al.*, 1980).

2-Transport actif

La diffusion facilitée ne permet pas de faire pénétrer un soluté contre un gradient de concentration et donc de le concentrer. Les bactéries vivent en général dans des milieux pauvres en nutriments. Un troisième type de transport est utilisé par la bactérie pour faire pénétrer les nutriments. La molécule est incorporée *via* une protéine ayant une grande affinité vis à vis du soluté à transporter. La pénétration de ce dernier nécessite l'apport d'énergie métabolique (ATP, potentiel protonique ou phosphoénolpyruvate). D'un point de vue cinétique, le transport actif est analogue à celui décrit par Michaelis-Menten pour les enzymes. Les transporteurs sont stéréospécifiques, inductibles, saturables et soumis aux phénomènes de régulation par inhibition compétitive.

Les perméases peuvent être classées en trois grands groupes :

-les uniports

Ce type de protéine véhicule une seule molécule et d'un seul côté à la fois de la membrane plasmique (Figure 11, page 55). Elle transporte en général des ions de manière à rééquilibrer les charges et la force ionique du milieu intracellulaire.

-les symports

Les symports permettent la pénétration de deux molécules dans le même sens. Les saccharides sont souvent incorporés par ce système avec des ions H_3O^+ ou Na^+ (Figure 11, page 55). Les bactéries utilisent couramment la force protonique pour faire entrer des molécules de saccharide. La perméase à lactose est un des systèmes de transport le plus étudié.

-les antiports

Les antiports ne permettent l'entrée d'une molécule que couplée à l'expulsion d'une autre. La pompe Na^+ , H_3O^+ , présente chez les bactéries, transporte un ion Na^+ vers l'extérieur et un ion H_3O^+ vers l'intérieur (Figure 11, page 55). Elle permet de réguler le pH intracellulaire des bactéries.

3-La translocation de groupe

En 1964, Kundig *et al.*, lors de travaux sur *Escherichia coli* et *Aerobacter cloacae*, décrivent la phosphorylation d'un saccharide en présence de phosphoénolpyruvate et de trois protéines qu'ils dénomment HPr, EI et II. Le système de la phosphotransférase est présent chez les bactéries aussi bien à Gram positif que négatif, de préférence chez les anaérobies strictes et facultatives. Ce type de transport permet donc la pénétration et la phosphorylation d'un saccharide (Figure 12, page 56).

a-HPr

C'est une protéine cytoplasmique qui transfère l'ion phosphate de la protéine EI vers la protéine II_A . Elle est toujours présente chez les bactéries ayant une translocation de groupe. Chez *Lactobacillus brevis* et *Lactobacillus buchneri*, les saccharides ne sont pas transportés par un système de phosphotransférase, mais la protéine HPr est présente. Elle aurait dans ce cas, un rôle de régulation (Reizer *et al.*, 1988). Elle possède une masse moléculaire comprise entre 6700 et 17 000 Da. La protéine HPr est couplée à la protéine II_A chez *E. coli* dans le transport du fructose (Geerse *et al.*, 1986; Waygood, 1980).

b-Protéine EI

La protéine EI est elle aussi cytoplasmique, et de plus, elle est présente chez tous les micro-organismes possédant un système de phosphotransférase. La protéine EI est le premier maillon de la chaîne de phosphotransfert, elle permet le transfert du phosphoénolpyruvate vers la protéine HPr. Pour être active, elle se dimérise sauf chez *Mycoplasma capricolum* (Jaffor Ullah et Cirillo, 1976), où elle se tétramérise. La masse moléculaire du monomère est de l'ordre de 58 à 85 kDa. Elle requiert pour son autophosphorylation, du magnésium et du manganèse mais pas pour le transfert du

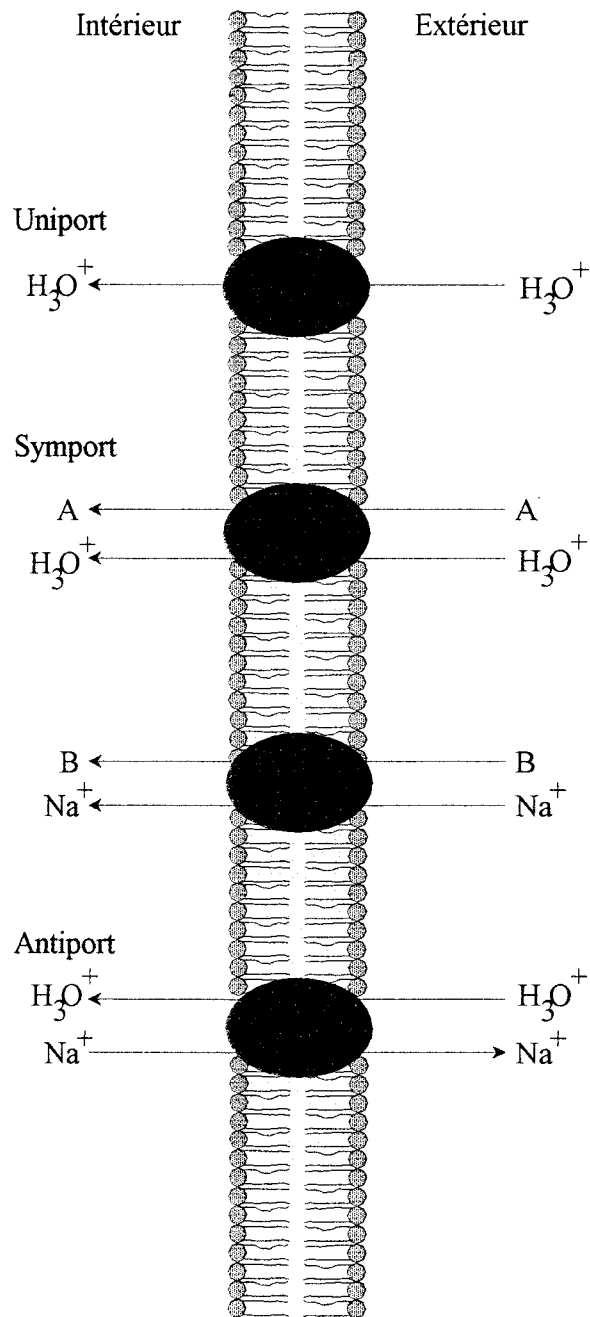


Figure 11 : Représentation schématique des différents types de transport actif.

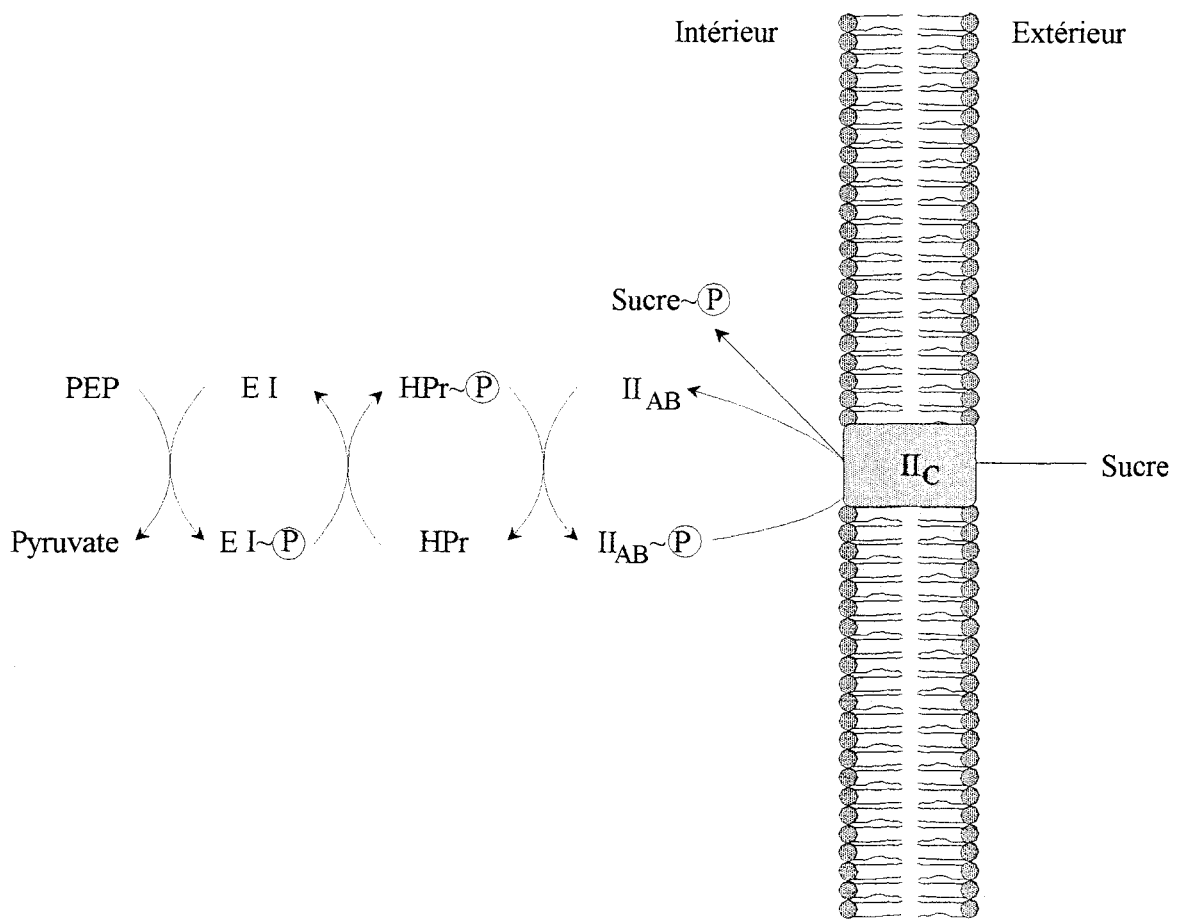


Figure 12 : Mécanisme de transport des saccharides par translocation de groupe.

phosphate sur la protéine HPr. La protéine EI est doublement phosphorylée, un phosphate par sous unité (Weigel *et al.*, 1982; Waygood, 1986) et elle est formée par deux domaines mais un seul porte l'activité phosphotransférase. L'activité phosphotransférase est régulée par des cystéines peu sensibles aux agents alkylants (Han *et al.*, 1987).

c-Protéines II

Les protéines II, divisées en trois catégories II_A, II_B et II_C, sont spécifiques du saccharide qu'elles véhiculent. Elles permettent la translocation et la phosphorylation du saccharide. Les protéines II_A et II_B sont des protéines cytoplasmiques, elles contiennent toutes les deux un site de phosphorylation. La protéine II_C est une protéine membranaire qui permet la pénétration du saccharide dans la bactérie. Elle peut se diviser en deux sous-unités II_C et II_D. Il existe trois arrangements principaux pour les protéines II :

- soit les protéines II_A et II_B sont liées à la protéine II_C (protéine II_{ABC})
- soit la protéine II_A est cytoplasmique et la protéine II_B est liée à la protéine II_C (protéine II_{BC})
- soit les protéines II_A et II_B sont cytoplasmiques et liées entre elles (protéine II_{AB})

La protéine II_A est phosphorylée par l'intermédiaire de la protéine HPr~P et transfère son groupement phosphate uniquement aux protéines II_{BC}. Les protéines II_{BC} peuvent transférer le groupement phosphate sur le saccharide qu'elles transportent.

En résumé, le saccharide extracellulaire est fixé par la protéine II_{BC} avec une grande affinité. Si la protéine II_{BC} n'est pas phosphorylée, le saccharide pénétrera dans la bactérie par diffusion facilitée. La phosphorylation de la protéine II_{BC} permet une rapide translocation du substrat sur la face cytoplasmique de II_{BC}. Puis le transfert du groupement phosphate s'effectue sur le saccharide, le saccharide ainsi phosphorylé est relâché dans le cytoplasme (Postma *et al.*, 1993).

B-Le transport des saccharides

1-Transport du lactose

Le lactose est incorporé par deux systèmes de transport, une translocation de groupe comme chez *Staphylococcus aureus* (Simoni *et al.*, 1973) ou par un symport à proton comme chez *Escherichia coli* (Kennedy, 1970).

Le système de la phosphotransférase est aussi présent chez les streptocoques (Honeyman et Curtiss, 1993), les lactobacilles (Chassy et Thompson, 1983a) et les lactocoques (Ye *et al.*, 1994). Le lactose est phosphorylé sur le carbone 6 du galactose lors de son entrée par la translocation de groupe. Les différentes phosphotransférases ont été purifiées et isolées chez *Staphylococcus aureus*. Les protéines spécifiques II_A et II_C sont spécifiques du lactose, et possèdent respectivement une masse moléculaire de 36 kDa et 33 kDa (Schrecker et Hengstenberg, 1971; Korte et Hengstenberg, 1971). Les gènes de la protéine II (*lacE*) et de la phospho-β-galactosidase (*lacG*) sont associés dans un même opéron chez *Streptococcus mutans* (Honeyman et Curtiss, 1993).

La perméase (symport à proton) à lactose a été caractérisée chez les lactobacilles (Leong-Morgenthaler *et al.*, 1991), les salmonelles (Mitchell *et al.*, 1982), les streptocoques (Foucaud et Poolman, 1992), chez *Leuconostoc lactis* (Vaughan *et al.*, 1996), chez *Citrobacter freundii* (Okazaki *et al.*, 1994) et chez *Escherichia coli* (West, 1970). C'est une protéine monomérique de 417 acides aminés (Kaback *et al.*, 1994). Elle est composée de douze domaines transmembranaires en hélices-α (Calamia et Manoil, 1990) qui forment un pore. L'incorporation du lactose est concomitante à la pénétration d'un seul proton (West et Mitchell, 1973).

La perméase à lactose est régulée par l'opéron lactose, ce dernier comprend trois gènes *lacZ*, *lacY* et *lacA* qui codent respectivement pour une β-galactosidase, la perméase et une thiogalactoside transacétylase. Cet opéron est inductible par le lactose aussi bien chez *Escherichia coli* (Beckwith, 1987) que chez *Citrobacter freundii* (Okazaki *et al.*, 1994).

La perméase à lactose, la protéine II_C^{Lac} du groupe de translocation du lactose et le système de transport du mélibiose chez *Escherichia coli* possèdent une certaine homologie de séquence (Vaughan *et al.*, 1996). Ces trois types de transport auraient-ils un ancêtre commun?

Les deux types de transport ne se rencontrent jamais chez la même espèce bactérienne, mais ils peuvent coexister dans le même genre bactérien. Chez les streptocoques, le lactose est véhiculé par un symport à proton (*Streptococcus thermophilus*) ou par un système de la phosphotransférase (*Streptococcus mutans*).

2-Transport du glucose

Le transport du glucose s'effectue par plusieurs mécanismes. Les plus courants sont le système de la phosphotransférase (Kundig et Roseman, 1971; Hickey *et al.*, 1986), le symport à proton (Opekarova *et al.*, 1994; Ye et Saier, 1995) et le symport à Na⁺ (Hirayama *et al.*, 1994; Sarker *et al.*, 1994). Deux autres transporteurs sont décrits dans la littérature, il s'agit d'une diffusion facilitée (Russel, 1990) et d'un mécanisme de transport couplé à la chaîne respiratoire (Barnes, 1972). Le glucose en entrant dans la cellule, est converti en glucose-6-phosphate via le système de la phosphotransférase, pour les autres mécanismes d'incorporation, le glucose ne subit aucune modification lors de son entrée.

Ces différents mécanismes de transport peuvent être présents à la surface de la même bactérie. Chez *Streptococcus mutans*, le glucose est incorporé par une translocation de groupe mais chez des mutants déficients en protéine EI, il y a possibilité d'utiliser un autre transporteur nécessitant de l'ATP pour phosphoryler le glucose (Buckley et Hamilton, 1994; Cvitkovith *et al.*, 1995b). Chez *Vibrio parahaemolyticus*, le système de la phosphotransférase cohabite avec un symport à Na⁺ (Sarker *et al.*, 1994). Ou encore, chez *Bacillus licheniformis*, Tangney et son équipe, en 1993, démontrent la présence d'un groupe de translocation et d'un autre système d'incorporation du glucose indépendant du phosphoénolpyruvate. De plus, l'activité de ces deux systèmes dépend de la phase de croissance de la bactérie. En phase exponentielle, les deux systèmes permettent la pénétration du saccharide, tandis qu'en phase stationnaire, seul le système de la phosphotransférase est actif (Tangney *et al.*, 1996).

Le glucose peut aussi être véhiculé par le système de phosphotransférase du mannose (Veyrat *et al.*, 1994).

3-Transport du galactose

Le galactose est incorporé par plusieurs systèmes. Ce transport peut s'effectuer soit par diffusion facilitée (Kornberg et Riordani, 1976), soit par un symport à proton (Henderson *et al.*, 1994), soit par un symport à Na^+ (Sarker *et al.*, 1996) ou encore par la méthylgalactose perméase (Me-Gal ou encore P-MG) (Richarme *et al.*, 1993; Weickert et Adhya, 1993). Ce dernier transporteur est composé de trois ou quatre protéines, l'une d'elle est péripasmique, les autres sont associées à la membrane.

De plus, le galactose est capable d'emprunter la translocation de groupe du lactose (Kaback, 1968; Chassy et Thompson, 1983b), la perméase du mélibiose ou encore le symport à proton de l'arabinose. La pénétration du galactose par une translocation de groupe entraîne la formation du galactose-6-phosphate.

L'ensemble de ces mécanismes de transport est classé en deux catégories, les transporteurs à haute affinité (le système P-MG, K_M 1 μM) et les transporteurs à basse affinité (symport à proton, diffusion facilitée, $50 < K_M < 450 \mu\text{M}$).

Plusieurs types de transporteurs peuvent cohabiter chez une bactérie. Chez *Escherichia coli*, deux systèmes sont présents et inductibles, la diffusion facilitée et le système de transport P-MG (Kornberg et Riordani, 1976; Weickert et Adhya, 1993).

4-Transport du fructose

Rhodospirillum rubrum utilise uniquement le fructose pour sa croissance. Il est transporté à l'intérieur de la bactérie *via* une translocation de groupe. Le fructose est phosphorylé sous la forme de fructose-1-phosphate et non de fructose-6-phosphate. La phosphorylation est toujours obtenue en C6 quand les saccharides sont transportés par un système de la phosphotransférase.

La fraction cytoplasmique et la fraction membranaire sont nécessaires pour la phosphorylation du fructose. La fraction cytoplasmique de *Rhodospirillum rubrum* ne peut être remplacée par les protéines HPr et EI de *Salmonella typhimurium*. Les protéines solubles de la translocation de groupe du fructose sont spécifiques, elles aussi, du fructose. L'espèce *Rhodopseudomonas spheroides* possède le même type de transport (Saier *et al.*, 1971).

Le fructose pénètre par l'intermédiaire de deux mécanismes chez *Haloferax volcanii*. Le système de transport principal est un symport à cation (Na^+) qui est inductible

par le fructose. Mais en absence d'induction, le fructose entre dans la bactérie par l'intermédiaire d'un transport passif (Takano *et al.*; 1995).

Le fructose est aussi transporté par un système de la phosphotransférase chez *Xanthomonas campestris* (de Crécy-Lagard *et al.*, 1995), *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* (Postma *et al.*, 1996); *Lactobacillus brevis* (Saier, *et al.*, 1996b) et chez *Streptococcus suis* (Dubreuil *et al.*, 1996).

Trois espèces de *Streptomyces* véhiculent le fructose par l'intermédiaire d'une translocation de groupe. Les systèmes sont inductibles chez deux espèces (*Streptomyces lividans* et *Streptomyces coelicolor*) tandis que chez *Streptomyces griseofuscus*, il est constitutif (Titgemeyer *et al.*, 1995).

Le transporteur du fructose chez *Agrobacterium radiobacter* est un système de transport actif mettant en jeu une protéine affine pour le fructose. Le fructose est ensuite converti en fructose-6-phosphate par une fructokinase ATP dépendante (Williams *et al.*; 1995).

Le fructose est aussi incorporé par le système de la phosphotransférase du mannose (Bourassa et Vadeboncoeur, 1992) et *vice-versa* (Kornberg et Lambourne, 1992).

5-Transport de la N-acétylglucosamine

Le transport de la N-acétylglucosamine a été peu étudié, mais il est complètement caractérisé chez *Escherichia coli*. La N-acétylglucosamine est véhiculée par un système de la phosphotransférase spécifique (White 1970), mais elle peut emprunter les différents systèmes de transport du glucose (Homer *et al.*, 1993). La N-acétylglucosamine est convertie en pénétrant dans la bactérie, en N-acétylglucosamine-6-phosphate. Le gène (*nag*) responsable du transport de la N-acétylglucosamine, code pour la protéine Π_C^{GlcNAc} (*nagE*), la GlcNAc-6-phosphate désacétylase (*nagA*) et la GlcNH₂-6-phosphate désaminase (*nagB*). Un seul gène est donc capable d'induire la pénétration et le métabolisme de la N-acétylglucosamine (Plumbridge, 1990; 1991). Le produit du gène *nagC* est un répresseur qui permet la régulation du gène *nag*.

Ce type de transport (groupe de translocation) a été mis en évidence chez *Lactobacillus sake* (Lauret *et al.*, 1996).

Récemment, Reizer et collaborateurs ont découvert le gène du transporteur et du métabolisme de la N-acétylgalactosamine chez *Escherichia coli* (Reizer *et al.*, 1996). Elle

serait véhiculée par une translocation de groupe homologue à celui du mannose, puis elle suivrait une voie similaire au métabolisme de la N-acétylglucosamine.

6-Conclusion

Plusieurs mécanismes de transport d'un seul saccharide peuvent être présents chez la même espèce bactérienne comme pour le glucose ou le galactose, tandis que pour le lactose, on n'en caractérise qu'un seul. La N-acétylglucosamine semble être incorporée par un seul mécanisme, un groupe de translocation. L'ensemble de ces résultats est résumé dans le Tableau V, page 63.

Chaque système de transport est régulé par son propre gène (opéron *lac* ou *nag*...). De plus, ils subissent l'influence des autres mécanismes d'incorporation et des différents métabolites formés.

C-Régulation du transport des saccharides

1-Régulation chez les entérobactéries

Chez *Escherichia coli*, la présence de glucose entraîne une inhibition de nombreux systèmes de transport des saccharides tel que le galactose ou le lactose (McGinnis et Paigen, 1969). Cette inhibition est levée dès que le glucose est complètement utilisé. Seuls le glucose et le glucose-6-phosphate ont une action inhibitrice sur le transport des saccharides. Cette inhibition a été corrélée à la présence du système de la phosphotransférase du glucose. Le transport du glycérol n'est pas dépendant du glucose.

En présence de glucose, la protéine Π_A^{Glc} est déphosphorylée, et se fixe au niveau des perméases membranaires (phénomène d'induction exclusion).

La protéine Π_A^{Glc} régule aussi la concentration de l'AMP cyclique intracellulaire. La concentration intracellulaire de l'AMP cyclique est directement liée à la transcription des enzymes du catabolisme. En présence d'une faible concentration en glucose, la protéine Π_A^{Glc} est phosphorylée, elle se fixe à l'adénylate cyclase. L'adénylate cyclase voit alors son activité augmentée, L'AMP cyclique se fixe sur son récepteur (CRP). Le CRP ainsi activé,

Tableau V : Les différents types de transports des sucres chez les bactéries

Type de transport	Sucre	Espèce bactérienne
Translocation de groupe	Lactose	<i>Lactobacillus bulgaricus helveticus casei</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Staphilococcus aureus</i> <i>Streptococcus mutans</i>
	Glucose	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bifidobacterium breve</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Lactobacillus casei sake</i> <i>Salmonella thyphimurium</i> <i>Streptococcus mutans</i> <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
	Galactose	<i>Lactobacillus casei</i>
	Fructose	<i>Escherichia coli</i> <i>Haloferax volcanii</i> <i>Lactobacillus sake brevis</i> <i>Rhodospirillum rubrum</i> <i>Rhodopseudomonas spheroides</i> <i>Rhodobacter capsulatus</i> <i>Salmonella thyphimurium</i> <i>Streptococcus suis</i> <i>Streptomyces Species</i> <i>Xanthomonas campestris</i>
	N-acétylglucosamine	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsellia pneumoniae</i> <i>Lactobacillus sake</i>
Symport à proton	Lactose	<i>Citrobacter freundii</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Leuconostoc lactis</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Streptococcus thermophilus</i>
	Glucose	<i>Chlorella kessleri</i> <i>Lactobacillus brevis</i>
	Galactose	<i>Escherichia coli</i>
Symport à Na ⁺	Glucose	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
	Galactose	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
Diffusion facilitée	Glucose	<i>Streptococcus bovis</i>
	Galactose	<i>Escherichia coli</i>
Autres perméases	Glucose	<i>Azotobacter vinelandii</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Helicobacter pylori</i> <i>Streptococcus mutans</i>
	Galactose	<i>Salmonella typhimurium</i>
	Fructose	<i>Agrobacterium radiobacter</i> <i>Xanthomonas campestris</i>

se fixe sur l'ADN et entraîne une augmentation de la transcription des enzymes du catabolisme. En présence d'un taux élevé de glucose, la protéine II_A^{Glc} n'est plus phosphorylée, elle ne se fixe plus sur l'adénylate cyclase et donc n'active plus la transcription (Saier, 1996).

La protéine Cra (répresseur/activateur catabolique) ou encore appelée répresseur du fructose (FruR) est une protéine tétramérique qui permet de réguler les enzymes de la néoglucogénèse. Cette régulation est indépendante de l'AMP cyclique. La protéine Cra possède deux modes d'action :

- soit une activation (comme pour la phosphoénolpyruvate carboxylase): la protéine Cra se fixe sur l'ADN, en amont du site de fixation de l'ARN polymérase, ceci permet d'activer la transcription du gène .

- soit une inhibition (comme pour la pyruvate kinase) : la protéine Cra se fixe sur l'ADN en aval du site de fixation de l'ARN polymérase, ceci entraîne une inactivation de la transcription.

Le glucose exogène est incorporé via une translocation de groupe. Le glucose est phosphorylé en 6 et transformé en fructose-1-phosphate et fructose-1,6-diphosphate. Ces métabolites se fixent sur la protéine Cra. Le complexe ainsi formé provoque une dissociation des brins d'ADN, entraînant soit dans le premier cas, une répression et dans le deuxième cas, une activation (Ramseier *et al.*, 1995).

2-Régulation chez les bactéries à Gram positif

Chez *Streptococcus mutans*, le glucose inhibe l'incorporation des saccharides. Chez un mutant de la protéine EI, le glucose inhibe faiblement l'incorporation du raffinose. Le système de la phosphotransférase du glucose a aussi une activité régulatrice du transport des saccharides (Cvitkovith *et al.*, 1995a).

Chez les bactéries à Gram positif à faible G+C mol %, la protéine CRP est absente. Mais un mécanisme de régulation catabolique a été mis en évidence chez *Bacillus subtilis* (Hueck et Hillen, 1995). La synthèse des enzymes du catabolisme est régulée par un mécanisme voisin de celui d'*Escherichia coli*.

Le glucose est converti en fructose-1,6-diphosphate qui se fixe sur la protéine HPr(Ser) kinase et la rend active. Cette kinase est ATP-dépendante. La protéine HPr(Ser) phosphorylée voit son taux augmenter et se fixe sur la protéine CcpA (Catabolite Control

Protein A). Ce complexe vient se fixer sur l'ADN au niveau des promoteurs et inhibe la transcription des opérons. Les régions de fixation du complexe CcpA-HPr(Ser) phosphorylé sont nommées CREs (Catabolite Responsive elements). La protéine CcpA agirait comme la protéine Cra, le complexe CcpA-HPr(Ser) phosphorylé activerait certains opérons (Hueck et Hillen, 1995).

La phosphorylation de la protéine HPr sur la sérine 46 entraîne la non phosphorylation du résidu d'histidine et empêche le bon fonctionnement des groupes de translocation. Elle inhibe donc la pénétration des saccharides via les systèmes de la phosphotransférase (Deutscher *et al.*, 1984). Cette inhibition serait levée par la complexation de la protéine HPr et de la protéine Π_A .

La protéine HPr(Ser) phosphorylée se complexe avec une phosphatase pour la rendre active. Ce complexe phosphatase-HPr(Ser) phosphorylé permet la déphosphorylation des saccharides cytoplasmiques (Benthin *et al.*, 1994). Les saccharides cytoplasmiques libres sont expulsés de la bactérie de manière à réguler leur taux intracellulaire (Saier *et al.*, 1996a). Cette régulation par une expulsion induite est souvent corrélée par la présence d'une phosphatase activée par la protéine HPr(Ser) phosphorylée.

La protéine HPr(Ser) phosphorylée se fixe sur les perméases qui deviennent inactives. Chez *Lactobacillus brevis*, l'HPr(Ser) phosphorylée se complexe au symport β -galactoside/ H^+ et le transforme en un mécanisme de diffusion facilitée (Ye *et al.*, 1994).

La phosphorylation de la protéine HPr sur la sérine 46 est régulée par la phosphorylation de l'histidine 15 et par le phosphate inorganique qui active la HPr(Ser) phosphatase (Saier *et al.*, 1996a).

Ces quatre mécanismes principaux de régulation de l'incorporation et du métabolisme, basés sur la phosphorylation de la sérine 46 de la protéine HPr sont résumés dans la Figure 13, page 66.

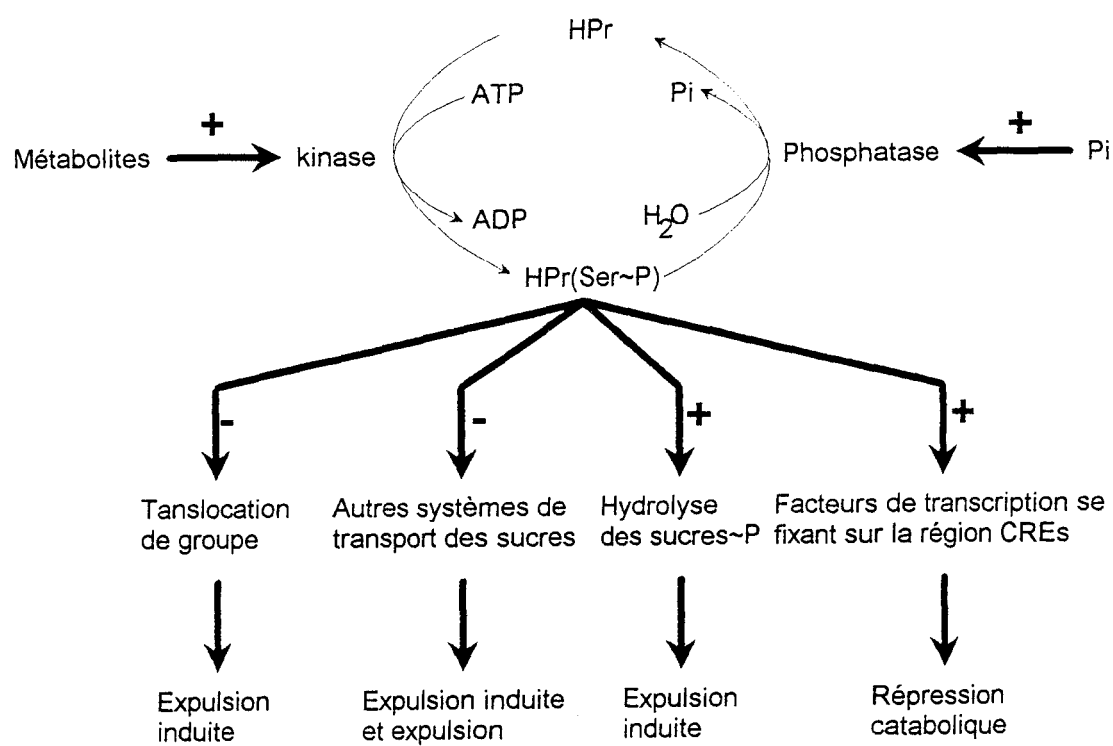


Figure 13 : Mode de répression du transport des sucres chez les bactéries à Gram positif selon Saier *et al.*, 1996.

Matériels et Méthodes

I-SOUCHE BACTERIENNE ETUDIE

Le micro-organisme utilisé lors de ce travail appartient à l'espèce *Bifidobacterium bifidum*. Il s'agit de la souche DSM 20082 d'origine humaine, isolée de fèces d'adulte. Elle nous a été fournie par le Dr Gavini (INRA, Villeneuve d'Ascq)

II-CONDITIONS DE CULTURE

A-Milieu Trypticase Phytone Yeast (TPY)

La croissance de *Bifidobacterium bifidum* est effectuée en milieu TPY (Scardovi, 1986) dont la composition est la suivante :

-Bio-trypticase (Biomérieux)	10g
-Bio-soyase (Biomérieux)	5g
-Extrait de levure (DIFCO)	2,5g
-Tween 80	1g
-Chlorhydrate de cystéine	0,5g
-K ₂ HPO ₄ , 2H ₂ O	2,6g
-MgCl ₂ , 6H ₂ O	0,5g
-ZnSO ₄ , 7H ₂ O	0,25g
-FeCl ₃	10mg
-CaCl ₂ , 2H ₂ O	0,2g
-H ₂ O	qsp 1000 mL
-pH 6,1	

La concentration des saccharides ajoutés avant l'autoclavage est la suivante, glucose : 5g/L, lactose : 10g/L et galactose : 5g/L. Le milieu est ensuite autoclavé pendant 30 minutes à 120°C. Dans le cas du fructose, de la N-acétylglucosamine et de la N-acétylgalactosamine, ces saccharides sont ajoutés au milieu à raison de 5g/L après stérilisation par filtration.

B-Milieu TPY-agar

Le milieu solide TPY-agar est composé des mêmes éléments décrits précédemment auxquels on ajoute de l'agar (1,8% p/v).

C-Milieu de Garches modifié

Le milieu de Garches modifié est un milieu semi-synthétique. Il sera utilisé pour déterminer la capacité de *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082 à assimiler les saccharides comme seule source de carbone. Le milieu de Garches modifié est composé de :

-Caséine hydrolysée à l'acide exempte de vitamines (MERCK)	10g
-Extrait de levure (DIFCO)	2,5g
-Chlorhydrate de cystéine	0,5g
-Acétate de sodium	3,66g
-Na ₂ HPO ₄ , 12H ₂ O	2,33g
-K ₂ HPO ₄ ,	0,9g
-MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,5g
-acide <i>p</i> -aminobenzoïque	1mg
-Biotine	0,01mg
-Pantothénate de calcium	1mg
- H ₂ O	qsp 1000 mL
-pH 6,1	

Le milieu est autoclavé à 120°C pendant 30 minutes. L'acide *p*-aminobenzoïque, les vitamines et les saccharides sont ajoutés au milieu après stérilisation par filtration. La concentration des saccharides est identique à celle utilisée dans le milieu TPY.

D-Conditions de culture

Les bactéries sont incubées à 39°C en jarre anaérobie sous atmosphère H_2 - CO_2 (Gas-Pak anaerobic system, Biomérieux) ou sous atmosphère H_2 - CO_2 - N_2 (10/10/80-v/v) dans une station anaérobie.

Les tubes renfermant 10 mL de milieu sont inoculés avec 1 mL de suspension bactérienne prise en phase exponentielle de croissance.

III-DOSAGES DES SACCHARIDES

A-Dosage des oses neutres

1-principe

La quantité d'hexoses neutres totaux est déterminée suivant la méthode de Tilmans et Philippi (1929), en utilisant la technique de Rimington (1931). L'étalonnage est effectué à l'aide du saccharide à doser.

2-Mode opératoire

100 μ l de solution de saccharides à doser

↳ 200 μ l de réactif à l'orcinol (Sigma) 1,5% (p/v) dans H_2SO_4 (R.P.) à 30% (v/v)

↳ 1500 μ l d'acide sulfurique 60% (v/v)

Après homogénéisation, les tubes sont placés 20 minutes à 80°C, puis refroidis dans un bain de glace. Les absorbances sont déterminées à 510 nm après un séjour de 45 minutes à l'obscurité.

Pour effectuer l'étalonnage, les 100 μ L de solution à doser sont remplacés par des solutions standard des saccharides dosés à 1 et 2 mM pour les monosaccharides et 0,5 et 1 mM pour les disaccharides.

B-Dosage des N-acétylhexosamines

1-Principe

Par chauffage en milieu alcalin, les N-acétylhexosamines donnent un chromogène qui se condense ensuite avec l'aldéhyde diméthylamino-4-benzoïque. Nous utilisons la méthode décrite par Good et Bessman (1964).

2-Réactifs

Tampon A : tétraborate de potassium

-Acide borique	1,12 mM
-KOH	0,56 mM

Tampon B : aldéhyde diméthylamino-4-benzoïque

-Aldéhyde diméthylamino-4-benzoïque	10 g
-Acide chlorhydrique concentré	12,5 mL
-Acide acétique glacial	87,5 mL

La solution est à diluer au dixième avec de l'acide acétique glacial au moment de l'emploi.

3-Mode opératoire

100 μ L de solution de N-acétylhexosamine à doser

↳ 100 μ L de tampon A

Les tubes bouchés sont placés à 100°C pendant 3 minutes, puis ils sont refroidis pendant 5 minutes dans un bain de glace.

800 μ L de tampon B dilué sont ajoutés, puis les tubes sont agités et placés 20 minutes à 37°C. Après retour à température ambiante, l'absorbance est lue à 585 nm.

L'étalonnage est réalisé à l'aide de la N-acétylglucosamine (1-10 $\mu\text{g/mL}$) et de la N-acétylgalactosamine (10-60 $\mu\text{g/mL}$).

IV-DÉTERMINATION DU MODE D'INCORPORATION DES SACCHARIDES

A-Principe

Les bifidobactéries sont incubées pendant des temps variables en présence de saccharides radiomarqués, la suspension bactérienne est ensuite filtrée sur une membrane de porosité 0,22 μm , afin de retenir les bactéries. Le filtre est lavé par 5 mL de tampon froid pour éliminer toute la radioactivité non incorporée par le micro-organisme.

B-Les différents saccharides utilisés

Tous les saccharides utilisés ont été obtenus chez Sigma. Les saccharides radiomarqués ont une activité spécifique de 54 mCi/mmol pour le lactose ([D-glucose-1- ^{14}C] lactose; Amersham), de 53 mCi/mmol pour la N-acétylglucosamine (N-acétyl-D-[1- ^{14}C] glucosamine; Amersham), de 1,46 mCi/mmol pour le fructose (D-[U- ^{14}C] fructose; Amersham), de 251,9 mCi/mmol pour le glucose (D-[U- ^{14}C] glucose, NEN Dupont) et de 29,5 mCi/mmol pour le galactose (D-[6- $^3\text{H}(\text{N})$] galactose; NEN Dupont).

Pour marquer le disaccharide β -D-Gal (1,3) GlcNAc, la N-acétylglucosamine utilisée possédait une activité spécifique de 54 mCi/mmol (N-acétyl-D-[1- ^{14}C] glucosamine; Amersham). Le lacto-N-biose a été doublement marqué à l'aide du galactose-1-phosphate (108 mCi/mmol, D-[U- ^{14}C] galactose-1-phosphate; Amersham) et de la N-acétylglucosamine (11,2 Ci/mmol, N-acétyl-D-[1- ^3H] glucosamine; Amersham).

C-Le transport des saccharides

20 mL de suspension bactérienne dans le milieu TPY, sont centrifugés à 2500 g, 10 minutes à 15°C. Le culot est remis en suspension dans le tampon imidazole 25 mM, pH 7

(tampon C), préalablement dégazé et centrifugé dans les mêmes conditions. Les bactéries, ainsi lavées, sont homogénéisées dans 1,8 mL de tampon C. La suspension bactérienne obtenue, est préincubée 5 minutes à 39°C, et on ajoute ensuite 200 μ L de solution contenant les saccharides. Des prélèvements (200 μ L) sont effectués à 1, 2, 5 et 8 minutes, ils sont filtrés sur des membranes de 0,22 μ m (Millipore) et lavés par 5 mL de tampon C froid. Les filtres sont séchés, puis transférés dans 4mL de liquide scintillant (Lipoluma) et la quantité de radioactivité incorporée est déterminée par un compteur à scintillation liquide (Beckman).

Les solutions mères de saccharide contiennent 5 mg/mL et 5 μ Ci pour les monosaccharides (glucose, fructose, galactose, N-acétylglucosamine) et 10 mg/mL et 5 μ Ci/mL pour les disaccharides (lactose, β -D-Gal (1,3) GlcNAc).

Les résultats obtenus sont la moyenne d'au moins trois expériences séparées.

D-Inhibition du transport

1-Par des inhibiteurs spécifiques des translocases

Les conditions expérimentales sont identiques aux précédentes (cf IV-C, page 72); mais le volume de la suspension bactérienne est réduit à 1,7 mL afin d'y incorporer 100 μ L d'inhibiteur. Les effecteurs métaboliques sont solubilisés dans l'éthanol sauf le fluorure de sodium qui est dissous dans le tampon C. Les inhibitions sont comparées avec leur témoin respectif.

Inhibiteur	mM	système inhibé	Références
CCCP	0,05	symport à proton	Keevil <i>et al.</i> , 1984
DCC	0,1	ATPase	Nalecz <i>et al.</i> , 1986
Lasalocid	0,01	ionophore à métal	Franklund et Glass, 1987
Menadione	0,1	transport d'électron	Franklund et Glass, 1987
NaF	15	phosphorylation	Haguenauer et Kepes, 1972
<i>o</i> -Phénanthroline	0,1	composé réagissant avec le fer	Mass et Glass, 1990

Les résultats obtenus sont la moyenne d'au moins trois expériences séparées.

2-Par d'autres structures saccharidiques

Les incubations sont effectuées dans un volume final de 500 μL contenant respectivement le tampon C, le saccharide radiomarké (concentration identique à l'expérience précédente) et le saccharide inhibiteur à 1 et 10 mg/mL. La suspension bactérienne est incubée 8 minutes à 39°C, puis 200 μL sont prélevés et filtrés sur membrane 0,22 μm . Les filtres sont traités suivant le même protocole que cité précédemment (cf IV-C, page 72).

Les résultats obtenus sont la moyenne d'au moins trois expériences séparées.

E-Incorporation des saccharides

Les bactéries sont incubées en milieu TPY (20 mL), à 39°C pendant une nuit. Elles sont centrifugées (2500 g/10 min/15°C), puis lavées avec le tampon C. Après une nouvelle centrifugation (2500 g/10 min/15°C), le culot bactérien est remis en suspension dans 0,8 mL de tampon C et préincubé 5 minutes à 39°C. 200 μL de solution de saccharide sont ajoutés et l'ensemble est incubé pendant 3 minutes. La suspension bactérienne est centrifugée (2500 g/10 min/4°C) et le culot ainsi obtenu, est lavé trois fois avec le tampon C glacé pour enlever la radioactivité extracellulaire. Les bifidobactéries sont ensuite homogénéisées dans 1mL de tampon C froid.

Cette suspension bactérienne est soumise à l'action des ultrasons dans les conditions suivantes :

-Appareillage	Branson Sonifier Cell Disruptor B30
-Amplitude	30 microns pic à pic
-Fréquence du traitement	33 secondes par minute
-Durée du traitement	5 minutes
-Température du traitement	4°C

La suspension est ensuite centrifugée 15 minutes à 45000 g à 4°C. Le surnageant obtenu et le milieu d'incubation sont déposés sur papier Whatman n°3 et soumis à une chromatographie descendante dans le solvant pyridine-acétate d'éthyl-acide acétique-eau (5:5:1:3, v/v) pendant 16 heures. Après séchage, le papier est découpé en bande horizontale

de 1 cm et la radioactivité est déterminée par scintillation liquide comme précédemment décrit (cf IV-C, page 72).

Des témoins de migration non radioactifs sont également déposés sur le chromatogramme, ils sont révélés par le réactif à l'oxalate d'aniline.

Les résultats obtenus sont la moyenne d'au moins trois expériences séparées.

F-Influence du donneur d'énergie sur l'incorporation des saccharides

1-Principe

Les bactéries sont perméabilisées par le toluène afin de permettre le passage de l'ATP ou du phosphoénolpyruvate qui pourront activer ou non, soit le transport des saccharides, soit les kinases. Les saccharides radiomarqués sont phosphorylés par leur enzyme respective, et ensuite précipités par le bromure de baryum. Cette technique est dérivée de la méthode de Gachelin (1969).

2-Réactifs

Nous avons utilisé trois tampons différents, le Tampon D qui contient de l'imidazole 25 mM, du $MgCl_2$ 5 mM et du fluorure de sodium 10 mM, pH 7. Le Tampon E est composé du tampon D et de l'ATP 10 mM. Le Tampon F contient le tampon D et du phosphoénolpyruvate 10 mM.

3-Perméabilisation des cellules

Les bifidobactéries sont centrifugées (2500 g/10 min/15°C), puis lavées avec le tampon D. Les culots sont homogénéisés dans 1 mL de tampon D, E ou F. 30 μ L de toluène/éthanol (1/9, v/v) sont ajoutés à la suspension bactérienne qui est agitée pendant 1 minute puis placée dans un bain de glace.

4-Incubation

800 μL de tampon D, E ou F

↻ 100 μL de suspension bactérienne perméabilisée

↻ 100 μL de saccharides radiomarqués

Les tubes sont incubés 30 minutes à 39°C.

5-Précipitation des saccharides phosphorylés

10 mL de BaBr_2 30 mM dans l'éthanol 90% (v/v) sont ajoutés au milieu d'incubation, puis placés dans la glace pendant 20 minutes. Les solutions sont filtrées sur 0,22 μm puis lavées par 5 mL d'éthanol à 80% (v/v) glacé. Les filtres sont séchés et mis à compter en scintillation liquide.

Les résultats obtenus sont la moyenne d'au moins trois expériences séparées.

G-Détermination des paramètres cinétiques de l'incorporation

Les paramètres apparents K_M et $V_{\max}$ de l'incorporation du lactose et du glucose sont déterminés selon la méthode de Lineweaver et Burk (1934) [$1/V = f(1/S)$] à l'aide du logiciel Enzfitter (biosoft).

L'incorporation des saccharides a été déterminée après incubation des bifidobactéries pendant 10 minutes à 39°C.

Les concentrations du lactose sont comprises entre 1 et 20 mM et celles du glucose entre 5 et 30 mM.

Les résultats obtenus sont la moyenne d'au moins trois expériences séparées.

V-DOSAGE DES PROTÉINES

A-Les protéines solubles

La concentration en protéine soluble est déterminée selon la méthode de Bradford (1976), en utilisant un kit commercialisé (Biorad), le Biorad[®] protein assay, et la sérum albumine bovine (Sigma) comme standard d'étalonnage.

B-Les protéines insolubles

Les bifidobactéries sont incubées 4 heures dans de la soude 0,1 M, afin de solubiliser les protéines membranaires. Ces dernières sont ensuite dosées à l'aide du réactif de Folin-Ciocalteu (Lowry *et al.*, 1951). la sérum albumine bovine (Sigma) est utilisée comme standard d'étalonnage.

VI-ACTIVITÉ β -D-GALACTOSIDASIQUE

A-Principe

Pour ce dosage, nous utilisons comme substrat le para-nitrophényl- β -D-galactopyranoside (Sigma) qui, lorsqu'il est hydrolysé, libère le galactose et le para-nitrophénol qui se colore en jaune en milieu basique. Ce principe est utilisé pour le doser par spectrophotométrie.

B-Mode opératoire

Le mode opératoire dérive de la technique mise au point par Conchie (1954).

100 μ L de pNP-Gal 5 mM

↻ 200 μ L de tampon imidazole 25 mM pH 6,5

↻ 100 μ L de la solution enzymatique

Après une incubation de 10 minutes à 39°C, la réaction est arrêtée par addition de 600 µL de carbonate de sodium (Na_2CO_3) 500 mM. La lecture est effectuée à 400 nm.

L'activité spécifique de la β -D-galactosidase est définie par le nombre de µmoles de para-nitrophénol libérées par minute et par mg de protéine.

Les résultats obtenus sont la moyenne d'au moins trois expériences séparées.

VII-ASSIMILATION DES SACCHARIDES

Pour l'assimilation des saccharides en tant que seule source de carbone, nous avons utilisé le milieu de Garches modifié (cf II-C, page 69). Ce milieu est utilisé car *Bifidobacterium bifidum* est incapable d'y proliférer sans adjonction de saccharides. Pour quantifier la consommation de saccharides, deux techniques ont été mises en oeuvre. La première consiste à doser les saccharides résiduels du milieu de culture en fonction du temps de culture. La deuxième, permet de quantifier le dégagement de chaleur dû au métabolisme du saccharide.

Les résultats obtenus sont la moyenne d'au moins trois expériences séparées.

A-Dosage des saccharides

La teneur en saccharides résiduels du milieu de culture a été dosée par la technique de Rimington (1931) pour les oses neutres et par la méthode de Good et Bessman (1954) pour les N-acétylhexosamines libres. Les deux protocoles ont été décrits précédemment (cf III, page 70).

B-Quantification du dégagement de chaleur par microcalorimétrie

L'utilisation de la calorimétrie pour l'étude de la croissance bactérienne a vu le jour dans les années 60. Cette technique permet de visualiser la croissance bactérienne, de différencier des espèces ou d'évaluer la consommation d'un substrat (Belaich et Belaich,

1976a; 1976b). De plus, la thermogénèse est reproductible et spécifique du substrat et de l'espèce étudiée. La faible utilisation de cette technologie est due au fait que les calorimètres de l'époque occupaient des surfaces importantes et qu'il était délicat de les manipuler. Depuis, les appareillages se sont miniaturisés, l'isolation a été améliorée ce qui permet, maintenant, de pouvoir mesurer des variations de puissance aussi infimes que de l'ordre du μ watt. Cette technique non destructrice permet donc de visualiser de très faibles croissances bactériennes et de récupérer la suspension de micro-organismes pour d'autres caractérisations. Ce principe a été utilisé par Meijer *et al.* (1994) pour estimer la contamination du lait en boîte.

1-Principe

Selon le principe de Calvet, deux cellules expérimentales sont placées dans un bloc calorimétrique qui impose une température constante. Deux fluxmètres sensibles et symétriques constitués de thermocouples connectés en série, entourent les cellules expérimentales et relient thermiquement ces cellules au bloc calorimétrique. Ils délivrent un signal électrique représentatif des échanges thermiques entre les deux cellules et le bloc calorimétrique.

L'appareil utilisé est un calorimètre à fluxmétrie différentielle (Calorimètre C80 Setaram). Pour la durée des expériences, la température est fixée à 39°C. Cette technique permet de mesurer les variations de chaleur entre la cellule échantillon et la cellule de référence contenant de l'eau. La variation de chaleur est corrélée à un signal électrique qui est visualisé grâce à un amplificateur et un enregistreur. Nous obtenons donc un profil de la variation de chaleur en fonction du temps, quand la chaleur augmente, le signal électrique est plus important et vice-versa.

Le tracé obtenu est un thermogramme dont l'amplitude de chacun des points est proportionnelle à la puissance thermique dégagée à l'instant considéré. Le thermogramme traduit globalement les événements énergétiques qui accompagnent la croissance.

La quantité de chaleur produite par les bactéries sera étudiée en fonction du milieu et du saccharide ajouté. Deux milieux de culture ont été utilisés pour chaque saccharide, le premier est le milieu TPY (milieu riche) qui permet d'étudier la capacité d'incorporation du saccharide. Le deuxième est le milieu de Garches modifié (milieu semi-synthétique), il ne contient que peu d'éléments nutritifs pour les bifidobactéries, dans ce cas, le saccharide

ajouté sera testé comme seule source de carbone. On mesurera en même temps son incorporation.

2-Mode opératoire

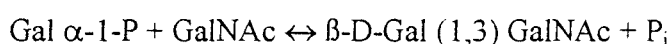
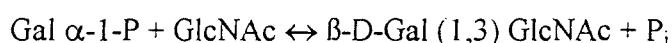
Une culture de *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082 âgée de 16 heures, obtenue en milieu TPY glucose sert à ensemercer par étalement des boîtes de Pétri contenant du TPY glucose-agar. Les bifidobactéries sont incubées 7 heures à 39°C en anaérobiose. Les bactéries sont ensuite récupérées et remises en suspension dans de l'eau physiologique.

Dans la cellule échantillon, 9 mL de milieu de Garches modifié ou de milieu TPY contenant le saccharide à étudier, sont inoculés avec 1 mL de cette suspension bactérienne. 500 µL d'huile de vaseline sont déposés à la surface de l'échantillon afin de garantir les conditions d'anaérobiose nécessaire à la croissance de *Bifidobacterium bifidum*. La cellule est rapidement remplacée dans le microcalorimètre.

VIII-FORMATION DES UNITES DISACCHARIDIQUES

A-Etude de la β -1,3 galactosyl-N-acétylhexosamine phosphorylase

Pour produire les disaccharides, nous avons utilisé la β -1,3 galactosyl-N-acétylhexosamine phosphorylase isolée de *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082. La β -1,3 galactosyl-N-acétylhexosamine phosphorylase est une enzyme intracellulaire qui hydrolyse les disaccharides suivants : β -D-Gal (1,3) GlcNAc et β -D-Gal (1,3) GalNAc pour donner du galactose-1-phosphate et de la N-acétylglucosamine ou de la N-acétylgalactosamine. L'enzyme est aussi capable de transférer à partir du galactose-1-phosphate, le galactose sur la N-acétylglucosamine ou la N-acétylgalactosamine. Ce transfert est accompagné d'une inversion de Walden.



1-Analyse des différents produits de la réaction

Pour doser les différents composés de la réaction, nous avons utilisé la chromatographie HPAE-PAD (Dionex). Les saccharides sont séparés sur une colonne Carbowac PA-100 (4x250mm, Dionex) conditionnée en soude 50 mM. La chromatographie est développée à un débit de 1 mL/min en utilisant les solvants suivants :

- solvant A : H₂O
- solvant B : 100 mM NaOH
- solvant C : 100 mM NaOH + 1 M acétate de sodium

Le gradient d'élution est le suivant :

Temps	Solvant A (%)	Solvant B (%)	Solvant C (%)
0	50	50	0
5	50	50	0
10	0	100	0
15	0	100	0
30	0	75	25

Afin de déterminer les concentrations des différentes molécules, l'appareil est étalonné avec des concentrations croissantes de chaque composé.

2-Détermination des paramètres cinétiques de la réaction de transfert

Nous avons étudié la formation du β -D-Gal (1,3) GlcNAc en fonction de la concentration en galactose-1-phosphate.

Sont incubés dans un volume final de 50 μ L (tampon imidazole 50 mM, pH 6,8) contenant des concentrations variables de galactose-1-phosphate, 5 μ L de N-acétylglucosamine (5mg/mL) et 5 μ L de solution enzymatique. L'ensemble est placé une

heure à 39°C. La réaction est arrêtée par l'ajout de 450 µL d'eau. 50 µL sont prélevés et injectés sur la colonne Carbopac PA-100 (cf VIII-A-1, page 81).

Les résultats obtenus sont la moyenne d'au moins trois expériences séparées.

3-Détermination des paramètres cinétiques de la réaction de phosphorolyse

Pour déterminer les paramètres cinétiques de la phosphorolyse, nous avons fait varier la concentration de β-D-Gal (1,3) GlcNAc en présence d'une concentration saturante de phosphate inorganique.

La solution enzymatique (5 µL) est incubée avec des concentrations variables de β-D-Gal (1,3) GlcNAc dans un volume final de 50 µL de tampon phosphate 50 mM, pH 6,8. La solution est placée à 39°C pendant une heure. La réaction est arrêtée par l'ajout de 450 µL d'eau. 50 µL de cette solution sont injectés sur la colonne (cf VIII-A-1, page 81).

Les résultats obtenus sont la moyenne d'au moins trois expériences séparées.

B- Production des disaccharides

1-Optimisation des conditions d'incubation

Les concentrations de galactose-1-phosphate et de N-acétylhexosamine étant fixées, nous avons voulu déterminer le temps d'incubation optimal pour l'obtention des disaccharides. Les incubats sont donc constitués de :

37 µL de tampon imidazole 25 mM, pH 6,8

↪ 5 µL de N-acétylglucosamine ou N-acétylgalactosamine (5mg/mL)

↪ 3 µL de Galactose-1-phosphate (10mg/mL)

↪ 5 µL de solution enzymatique

Les incubats sont placés à 39°C pendant des temps variables, puis dilués avec 450 µL d'eau avant d'être analysées en HPAE-PAD (cf VIII-A-1, page 81).

2-Synthèse des disaccharides

370 μ L de tampon imidazole 25 mM, pH 6,8

↪ 50 μ L de N-acétylglucosamine ou N-acétylgalactosamine (5mg/mL)

↪ 30 μ L de Galactose-1-phosphate (10mg/mL)

↪ 50 μ L de solution enzymatique

L'ensemble est incubé 16 heures à 39°C, puis injecté sur une colonne de TSK HW-40S (Merck) équilibrée en H₂O afin de séparer les différentes molécules. Les saccharides sont repérés à la sortie de colonne par détection à l'orcinol sulfurique. Les fractions contenant les disaccharides sont regroupées et lyophilisées. Les disaccharides lyophilisés sont rassemblés afin d'obtenir un stock suffisant pour permettre l'étude de leur transport.

Résultats et Discussion

Les bifidobactéries sont des bactéries saccharolytiques, elles incorporent les saccharides afin de les dégrader pour produire de l'énergie ou former des macromolécules nécessaires à leur croissance. Nos travaux se divisent en deux parties majeures, la première est l'étude de la croissance de *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082 sur différents milieux (TPY et Garches modifié), la deuxième partie permettra de mieux comprendre les mécanismes d'incorporation des saccharides.

I-CROISSANCE DES BIFIDOBACTÉRIES

A-Croissance en milieu TPY

Les études en microcalorimétrie montrent que le milieu TPY (milieu riche) permet la croissance de *Bifidobacterium bifidum*, en absence ou en présence de saccharide (glucose, galactose, fructose, lactose, N-acétylglucosamine et N-acétylgalactosamine). Le thermogramme obtenu en milieu TPY sans ajout de saccharides, est caractérisé par un pic après 75 minutes de culture et une croissance bactérienne durant 10 heures (Figure 14, page 86). La surface du pic permet de calculer une quantité de chaleur dégagée qui est ici, équivalente à 4,9 J pour le TPY sans ajout de saccharide.

La présence de saccharides dans le milieu de culture augmente le temps de la croissance bactérienne qui avoisine alors les 22 heures.

L'ajout de N-acétylhexosamine dans le milieu TPY, entraîne une légère augmentation de la quantité de chaleur dégagée. Le thermogramme des bifidobactéries en milieu TPY + N-acétylglucosamine est similaire à celui obtenu en TPY (Figure 15, page 87). Cette observation est confirmée par la faible consommation de la N-acétylglucosamine (1g/L) par *Bifidobacterium bifidum* au cours de sa croissance. Le thermogramme de *Bifidobacterium bifidum* en présence de N-acétylgalactosamine (Figure 16, page 87) fait apparaître un deuxième épaulement vers la huitième heure de culture, la quantité de chaleur dégagée totale est dans ce cas plus grande (7,31 J). Cette augmentation de la quantité de chaleur dégagée est à rapprocher d'une consommation plus importante de la N-acétylgalactosamine (1,6 g/L) par rapport à celle de la N-acétylglucosamine (1 g/L).

Les thermogrammes obtenus quand *Bifidobacterium bifidum* est cultivé en milieu TPY + glucose ou galactose sont similaires. Ils présentent tous les deux, un pic mineur

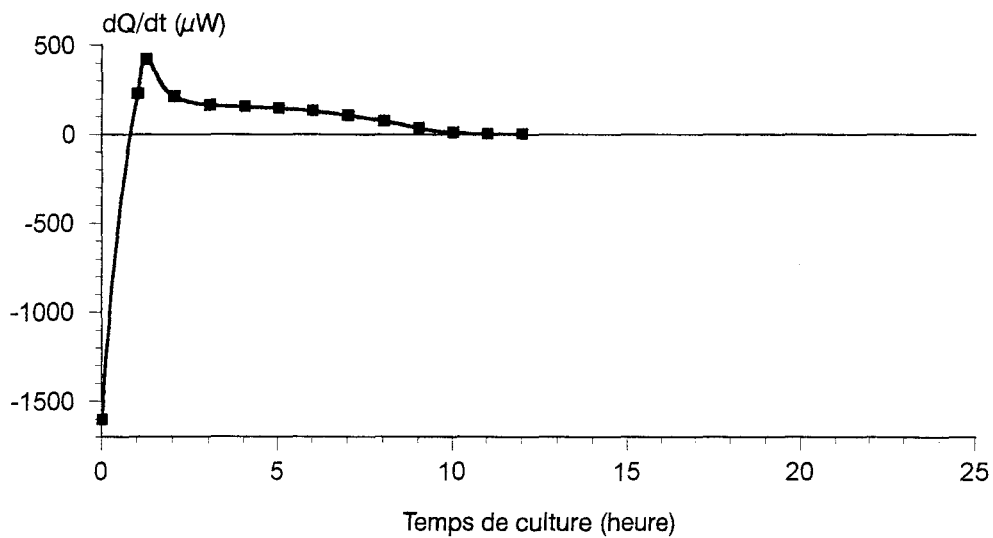


Figure 14 : Thermogramme obtenu lors d'une culture de *Bifidobacterium bifidum* en TPY sans saccharide. Symbole : (■) puissance thermique. $Q_T = 4,9$ J.

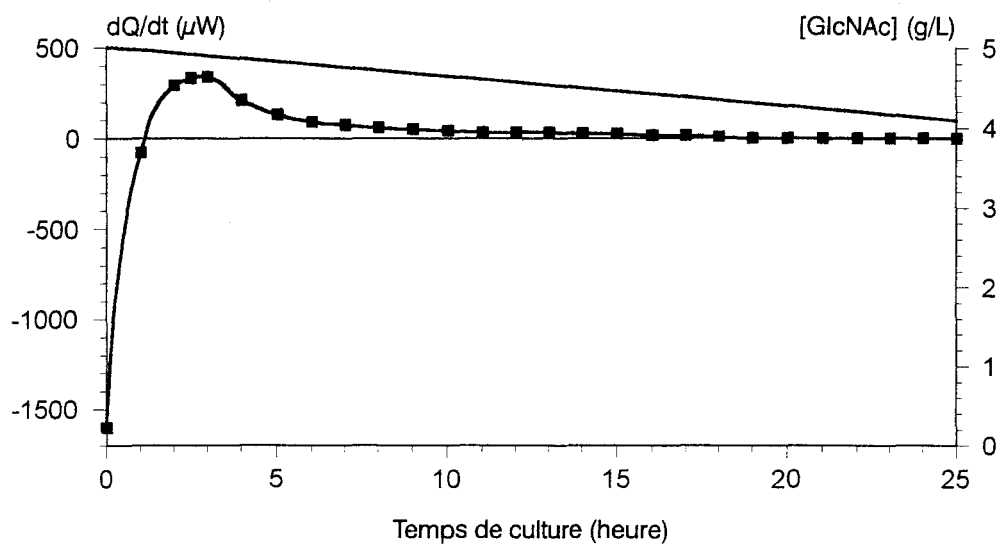


Figure 15 : Thermogramme obtenu lors d'une culture de *Bifidobacterium bifidum* en TPY + N-acétylglucosamine. Symbole : (■) puissance thermique, (—) consommation de la N-acétylglucosamine. $Q_T = 5,25$ J.

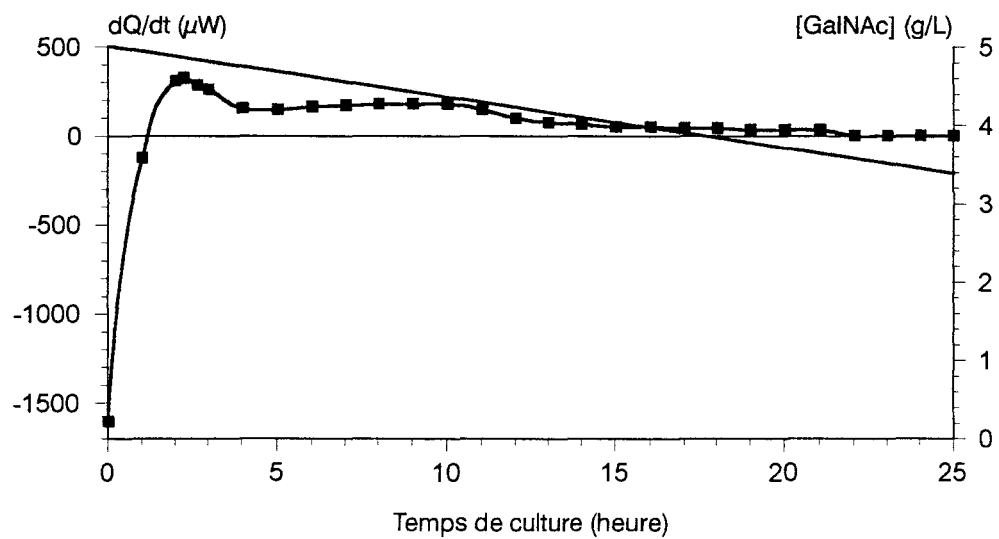


Figure 16 : Thermogramme obtenu lors d'une culture de *Bifidobacterium bifidum* en TPY + N-acétylgalactosamine. Symbole : (■) puissance thermique, (—) consommation de la N-acétylgalactosamine. $Q_T = 7,31$ J.

vers la deuxième heure et un pic majeur après six heures de culture (Figures 17 et 18, page 89). Les thermogrammes obtenus pour les milieux TPY + lactose ou fructose sont caractérisés par la présence d'un seul pic avec disparition de l'épaulement. La puissance maximale dissipée est mesurée après cinq heures de culture (Figures 19 et 20, page 90). La consommation des saccharides est à corrélérer avec la quantité totale de chaleur dégagée en milieux TPY + glucose, ou lactose, ou galactose (Figures 17 et 18, page 89 et Figure 19, page 90).

En conclusion de cette étude, nous avons démontré que *Bifidobacterium bifidum* est capable de croître sur un milieu TPY sans ajout de saccharide, ce qui confirme bien la capacité des bifidobactéries à consommer les hydrolysats enzymatiques de caséine (facteur de Raynaud, BF2). Tous les saccharides utilisés en supplémentation de ce milieu sont consommés à différent niveau par *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082. Cette variation de consommation peut être, en général, rapprochée de la quantité totale de chaleur dégagée. Dans le milieu renfermant du fructose, la consommation de ce dernier est inférieure à celle obtenue pour le galactose, par contre la quantité de chaleur dégagée (25,68 J) est supérieure à celle du galactose (19,54 J). Le métabolisme du fructose entraîne une dissipation de chaleur plus importante que les autres saccharides. Le fructose emprunterait une voie métabolique différente de celle des autres oses neutres, et celle-ci produirait plus de chaleur que la voie du "shunt bifide".

B-Croissance en milieu de Garches modifié

Le milieu de Garches modifié est un milieu semi-synthétique sur lequel *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082 ne se développe pas. Sur ce milieu en absence de saccharide, la quantité de chaleur dégagée est nulle. La seule présence des acides aminés ne permet pas la croissance de *Bifidobacterium bifidum*. Les saccharides apportés au milieu, lors de ces expériences, peuvent être considérés comme seule source de carbone disponible pour ces bactéries. Les saccharides, dans notre travail, peuvent être classés en deux catégories, les N-acétylhexosamines et les saccharides neutres.

Les bifidobactéries prolifèrent en milieu de Garches modifié renfermant des N-acétylhexosamines. Les thermogrammes obtenus pour des milieux renfermant de la N-acétylglucosamine ou de la N-acétylgalactosamine sont différents, il en est de même pour la consommation en saccharides. Pour le milieu de Garches modifié en présence de N-

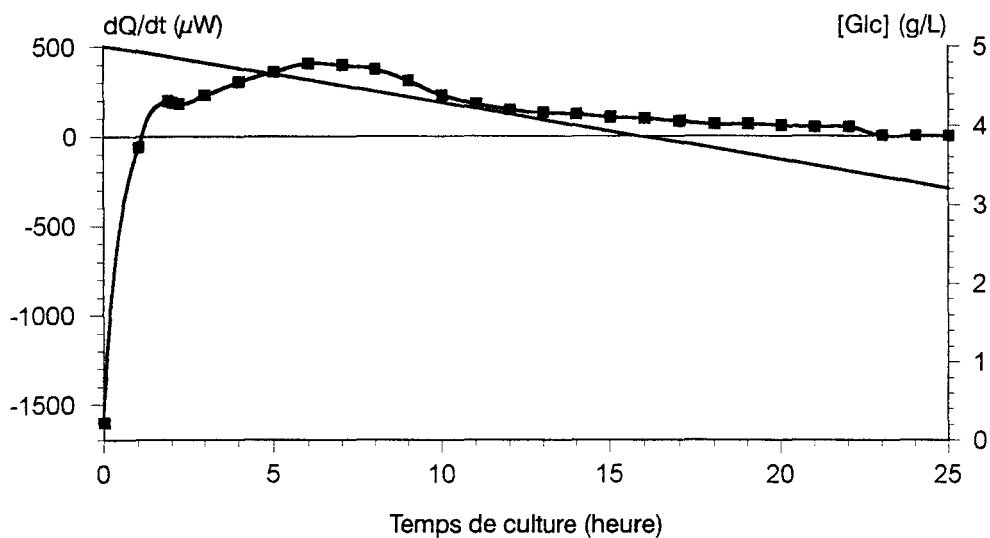


Figure 17 : Thermogramme obtenu lors d'une culture de *Bifidobacterium bifidum* en TPY + glucose. Symbole : (■) puissance thermique, (—) consommation du glucose. $Q_T = 14,43$ J.

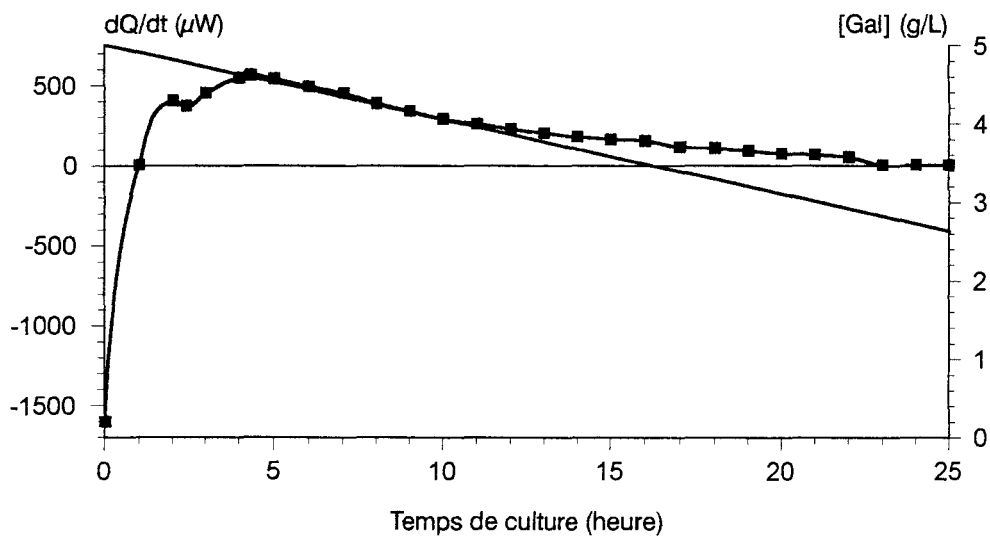


Figure 18 : Thermogramme obtenu lors d'une culture de *Bifidobacterium bifidum* en TPY + galactose. Symbole : (■) puissance thermique, (—) consommation du galactose. $Q_T = 19,54$ J.

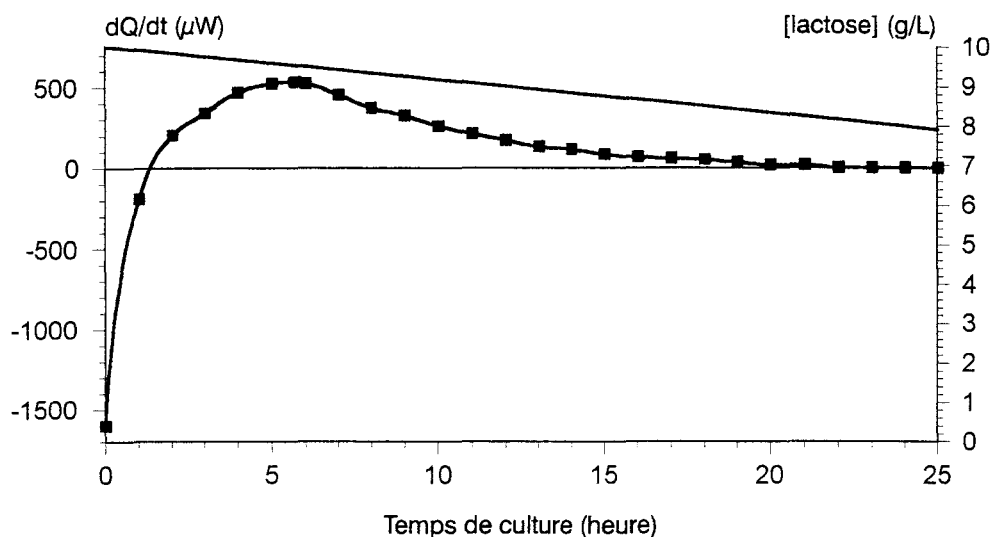


Figure 19 : Thermogramme obtenu lors d'une culture de *Bifidobacterium bifidum* en TPY + lactose. Symbole : (■) puissance thermique, (—) consommation du lactose. $Q_T = 16,97 \text{ J}$.

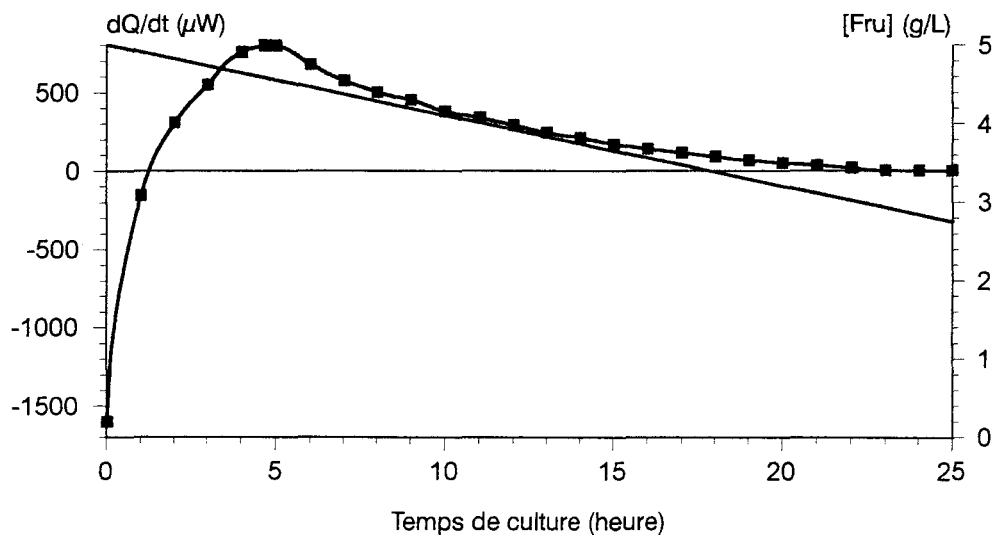


Figure 20 : Thermogramme obtenu lors d'une culture de *Bifidobacterium bifidum* en TPY + fructose. Symbole : (■) puissance thermique, (—) consommation du fructose. $Q_T = 25,68 \text{ J}$.

acétylglucosamine, la croissance bactérienne est réalisée en deux temps (Figure 21, page 92), une phase de latence (durée 20h) où la consommation de saccharide et la quantité de chaleur dégagée sont quasiment nulles, et une phase de croissance (durée 26h) où la N-acétylglucosamine est presque totalement assimilée (4,66g/L). Dans ces conditions, la quantité de chaleur totale dégagée est de 26,41 J. La N-acétylgalactosamine est incorporée dès les premières heures mais de manière très lente. On remarque cependant qu'il n'y a pas de temps de latence et que la croissance se déroule sur une période de 46 heures (Figure 22, page 92). La quantité de chaleur dégagée (13,92 J) est plus faible que dans le cas de la N-acétylglucosamine, et la quantité de N-acétylgalactosamine restante est plus importante (2,5g/L).

Les bifidobactéries en milieu semi-synthétique supplémenté en oses neutres, sont incapables de croître. Les thermogrammes obtenus en présence de glucose, de galactose (Figure 23 et Figure 24, page 93), de lactose et de fructose (Figure 25 et Figure 26, page 94) sont similaires. Ils sont caractérisés par une faible quantité de chaleur dissipée, associée à une faible consommation des saccharides (1g/L pour les monosaccharides et 2g/L pour les disaccharides).

C-Discussion

Bifidobacterium bifidum est capable de croître en milieu TPY en absence de saccharides. Il utilise ainsi les hydrolysats enzymatiques de caséine pour sa croissance, alors que les hydrolysats acides de caséine (Garches modifié) ne le permettent pas. Cette propriété a déjà été mise en évidence dans les travaux de Seka Assi (1982).

Tous les saccharides sont incorporés lors d'une culture dans un milieu riche (TPY par exemple), et on peut supposer qu'ils sont dégradés par *Bifidobacterium bifidum* afin de fournir de l'énergie. Les oses neutres ne permettent pas la croissance de *Bifidobacterium bifidum* en milieu semi-synthétique (Garches modifié par exemple). Cependant, l'ajout ou la présence de N-acétylhexosamines dans le milieu de Garches modifié entraîne la prolifération des bifidobactéries, elles peuvent dans ces conditions être considérées comme la seule source de carbone assimilable par *Bifidobacterium bifidum*.

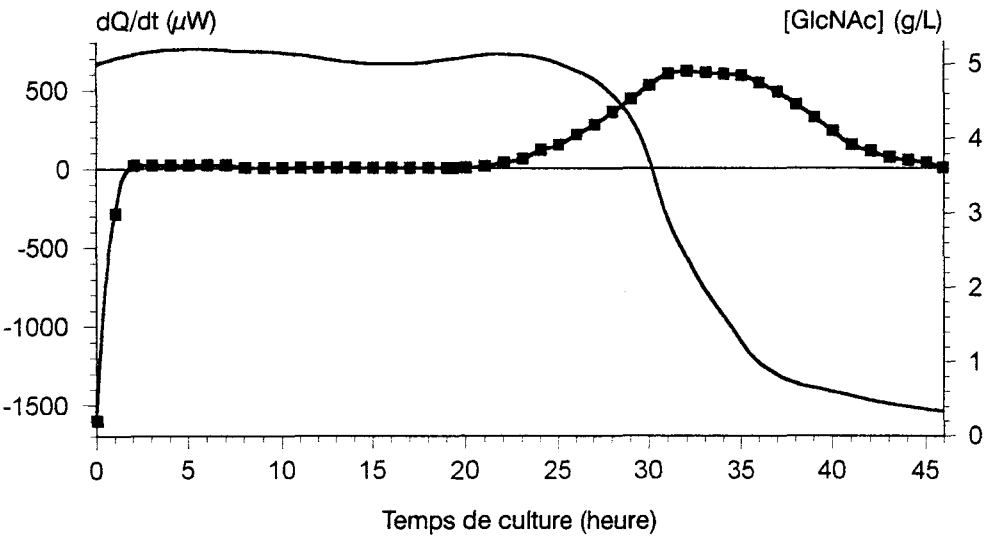


Figure 21 : Thermogramme obtenu lors d'une culture de *Bifidobacterium bifidum* en Garches modifié + N-acétylglucosamine. Symbole : (■) puissance thermique, (—) consommation de la N-acétylglucosamine. $Q_T = 26,44$ J.

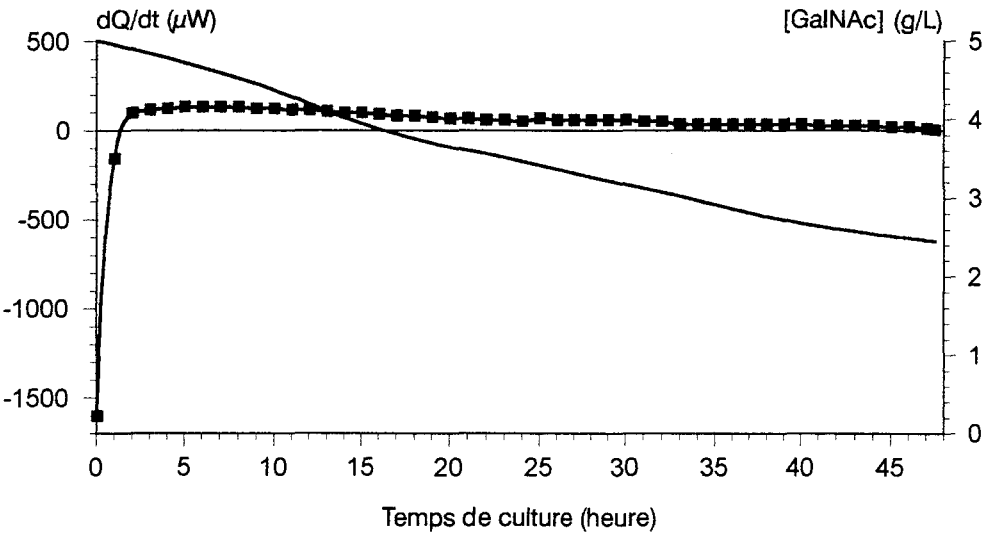


Figure 22 : Thermogramme obtenu lors d'une culture de *Bifidobacterium bifidum* en Garches modifié + N-acétylgalactosamine. Symbole : (■) puissance thermique, (—) consommation de la N-acétylgalactosamine. $Q_T = 13,92$ J.

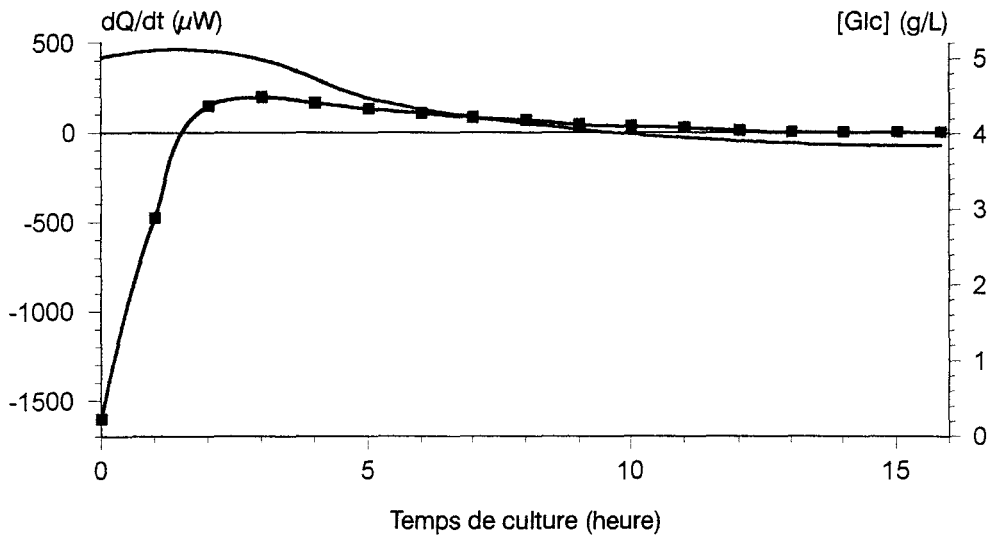


Figure 23 : Thermogramme obtenu lors d'une culture de *Bifidobacterium bifidum* en Garches modifié + glucose. Symbole : (■) puissance thermique, (—) consommation du glucose. $Q_T = 3,96$ J.

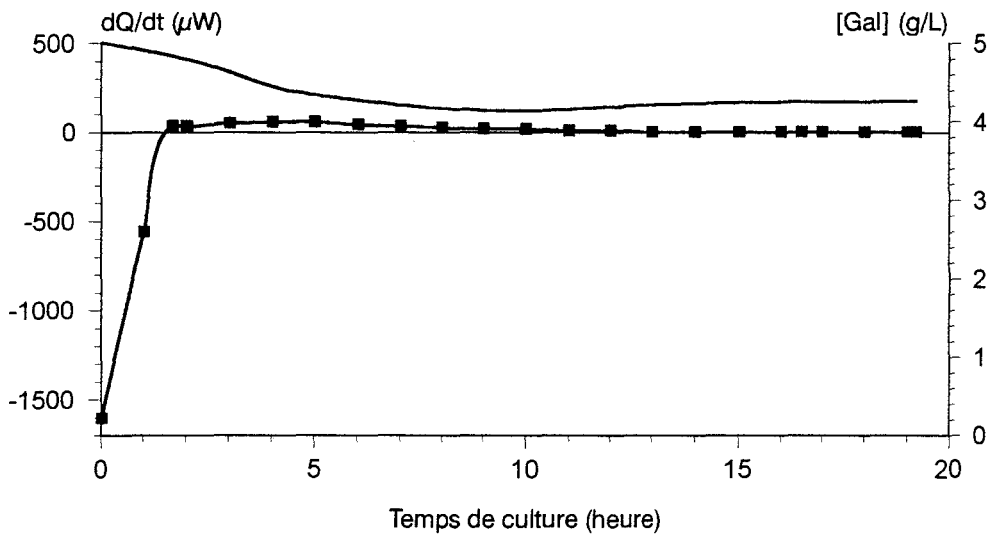


Figure 24 : Thermogramme obtenu lors d'une culture de *Bifidobacterium bifidum* en Garches modifié + galactose. Symbole : (■) puissance thermique, (—) consommation du galactose. $Q_T = 1,21$ J.

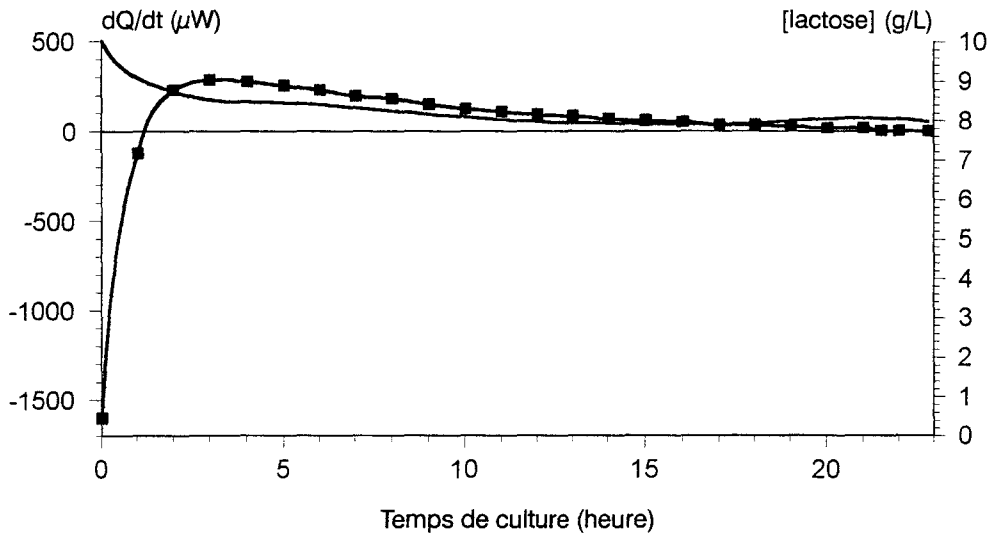


Figure 25 : Thermogramme obtenu lors d'une culture de *Bifidobacterium bifidum* en Garches modifié + lactose. Symbole : (■) puissance thermique, (—) consommation du lactose. $Q_T = 5,51$ J.

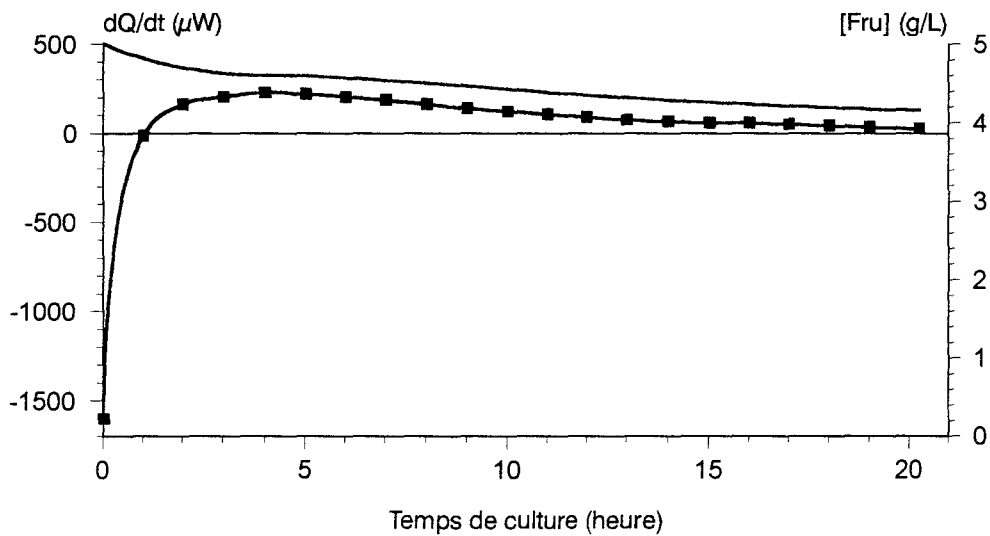


Figure 26 : Thermogramme obtenu lors d'une culture de *Bifidobacterium bifidum* en Garches modifié + fructose. Symbole : (■) puissance thermique, (—) consommation du fructose. $Q_T = 5,55$ J.

La croissance de *Bifidobacterium bifidum* en milieu TPY avec ou sans saccharides ajoutés donnera une quantité totale de chaleur dégagée qui ne peut être inférieure à 4,9 joules (témoin).

La quantité de chaleur dégagée peut être rapprochée de la consommation des saccharides ajoutés dans le milieu TPY. Elle est d'autant plus élevée que le micro-organisme consomme plus de saccharides (Tableau VI, page 96). Ce résultat est aussi observé lors de l'utilisation du milieu de Garches modifié (Tableau VII, page 96).

Cependant, il est à noter le comportement particulier du fructose. En effet, si nous comparons les résultats obtenus pour le fructose à ceux du galactose par exemple, on remarque qu'à même consommation de saccharide, les quantités de chaleur dégagée sont très différentes et toujours supérieures dans le cas du fructose. L'absence de prolifération en milieu semi-synthétique et en présence de ces saccharides, nous permet d'affirmer qu'ils ne sont pas assimilables comme seule source de carbone. La chaleur dégagée ne peut pas dans ces conditions être le reflet de la biosynthèse de système macromoléculaire. Dans ce dernier cas, l'intégration directe du fructose devrait se traduire par une quantité de chaleur dégagée plus faible. Il nous faut donc admettre que le fructose est susceptible d'emprunter des voies métaboliques différentes de celles du "shunt bifide".

La croissance sur milieu semi-synthétique en présence de N-acétylhexosamine est à rapprocher des observations réalisées par Rose *et al.* (1954) qui démontraient que les saccharides N-acétylés et en particulier ceux du lait de Femme possédaient une activité "bifidogène". *Bifidobacterium bifidum* peut par l'intermédiaire de ces glycosidases aboutir aux structures N-acétylés assimilables et permettre ainsi sa croissance. Le facteur BF1 (gynolactose) ne devrait être considéré que comme une source de carbone et d'azote directement assimilable par *Bifidobacterium bifidum*, et non pas comme un facteur de croissance.

La croissance de *Bifidobacterium bifidum* en milieu TPY supplémenté par de nombreux saccharides, nous a amené à étudier le mécanisme et la capacité de transport membranaire des saccharides chez ce micro-organisme.

II-LA FORMATION DU LACTO-N-BIOSE

Avant d'étudier les mécanismes de transport des disaccharides obtenus *in vivo* après dégradation des mucines, il nous a fallu produire ces unités saccharidiques en

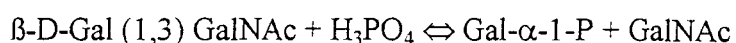
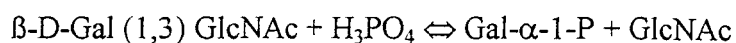
Tableau VI : Chaleur totale dégagée lors des cultures de bifidobactéries en milieu TPY.

	Chaleur totale (J)	Saccharide consommé (g/L)
sans sucre	4,9	0
galactose	$19,54 \pm 1,41$	$2,65 \pm 0,55$
lactose	$16,97 \pm 1,06$	$2,1 \pm 0,09$
glucose	$14,43 \pm 0,48$	$1,8 \pm 0,22$
N-acétylgalactosamine	$7,31 \pm 1,65$	$1,62 \pm 0,19$
N-acétylglucosamine	$5,25 \pm 0,37$	$0,91 \pm 0,03$
fructose	$25,68 \pm 1,33$	$2,26 \pm 0,17$

Tableau VII : Chaleur totale dégagée lors des cultures de bifidobactéries en milieu de Garches modifié.

	Chaleur totale (J)	Saccharide consommé (g/L)
sans sucre	0	0
N-acétylglucosamine	$26,41 \pm 0,85$	$4,67 \pm 0,14$
N-acétylgalactosamine	$13,92 \pm 2,8$	$2,55 \pm 0,4$
lactose	$5,51 \pm 2,86$	$2,04 \pm 0,04$
glucose	$3,96 \pm 0,4$	$1,16 \pm 0,06$
galactose	$1,21 \pm 0,07$	$0,74 \pm 0,06$
fructose	$5,55 \pm 1,59$	$0,84 \pm 0,04$

quantité suffisante. Pour ce faire, nous allons utiliser les propriétés de la β -1,3 galactosyl-N-acétylhexosamine phosphorylase, enzyme intracellulaire de *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082. Cette enzyme permet d'une part d'effectuer la phosphorolyse de la molécule et d'autre part de resynthétiser la molécule. Cette synthèse se déroule sans modification de structure à l'exception d'une inversion de Walden.



A-Détermination des paramètres cinétiques

La température optimale ainsi que le pH optimum seront différents selon que l'enzyme travaillera dans un sens ou dans l'autre. Les valeurs s'établissent respectivement autour de 50°C et de 6-6,5 dans le sens de la phosphorolyse et de 45-50°C et 5,5-6 dans le sens du transfert. La β -1,3 galactosyl-N-acétylhexosamine phosphorylase se caractérise par une spécificité très grande, en effet jusqu'à présent il n'a été possible de la faire agir que sur des substrats disaccharidiques renfermant de la N-acétylglucosamine ou de la N-acétylgalactosamine (la N-acétylmannosamine n'est pas reconnue) et le galactose, la N-acétylglucosamine ou la N-acétylgalactosamine pour la réaction de transfert. Le système enzymatique est indépendant du taux d'ATP intracellulaire (Dron *et al.*, soumis à publication).

L'activité de la β -1,3 galactosyl-N-acétylhexosamine phosphorylase est réversible. Pour déterminer les paramètres cinétiques de la réaction de transfert et de la phosphorolyse, nous avons fait varier la concentration du lacto-N-biose en présence de phosphate en concentration saturante et la concentration de galactose-1-phosphate en présence d'un excès de N-acétylglucosamine.

-Dans le sens du transfert, les paramètres s'établissent ainsi :

$$K_M = 1,56 \pm 0,49 \text{ mM}$$

$$V_{\max} = 60,83 \pm 9,01 \text{ nmol de } \beta\text{-D-Gal (1,3) GlcNAc formées/min/mg de protéine}$$

-Dans le sens de la phosphorolyse, les paramètres s'établissent ainsi :

$$K_M = 5,4 \pm 1,06 \text{ mM}$$

$$V_{\max} = 712,83 \pm 74,83 \text{ nmol de Gal-1-phosphate formées/min/mg de protéine}$$

La β -1,3 galactosyl-N-acétylhexosamine phosphorylase présente une affinité trois fois plus grande pour le galactose-1-phosphate ($V_{\max}/K_M=39$) que pour le β -D-Gal (1,3) GlcNAc ($V_{\max}/K_M=132$). Cependant, la phosphorolyse s'effectue avec une vitesse douze fois supérieure à celle du transfert.

B-Synthèse des deux unités disaccharidiques

Pour réaliser la synthèse des deux disaccharides, les incubations ont été effectuées à 39°C durant 16 heures, ces paramètres permettent d'optimiser la formation des disaccharides (Figure 27, page 99).

Nous avons synthétisé deux types de lacto-N-biose radioactif, l'un marqué uniquement sur la N-acétylglucosamine et un autre marqué à la fois sur le galactose ($U^{14}C$) et tritié sur la N-acétylglucosamine. Le premier servira lors des études d'inhibition des translocases, tandis que le second sera utilisé pour l'étude de l'influence de l'ATP et du phosphoénolpyruvate sur la phosphorylation du lacto-N-biose ainsi que pour la caractérisation des composés intracellulaires formés.

III-TRANSPORT DU GLUCOSE

Comme nous venons de le voir, *Bifidobacterium bifidum* est susceptible de croître en milieu TPY + glucose. La première question que l'on peut se poser est de savoir s'il y a une possibilité d'induction du système de transport. Des expériences ont été réalisées en utilisant des cultures de *Bifidobacterium bifidum* en présence de différents saccharides. Nous avons remarqué que la capacité d'incorporation du glucose est trois fois supérieure lors d'une culture en TPY + glucose ($3,75 \pm 0,42$ nmol de glucose incorporées/min/mg de protéine) par rapport aux bifidobactéries mis en culture en TPY + lactose ($1,27 \pm 0,08$ nmol de glucose incorporées/min/mg de protéine).

Sans que l'on puisse considérer que le mécanisme d'incorporation du glucose soit un système inductible chez *Bifidobacterium bifidum*, il faut toutefois admettre que le

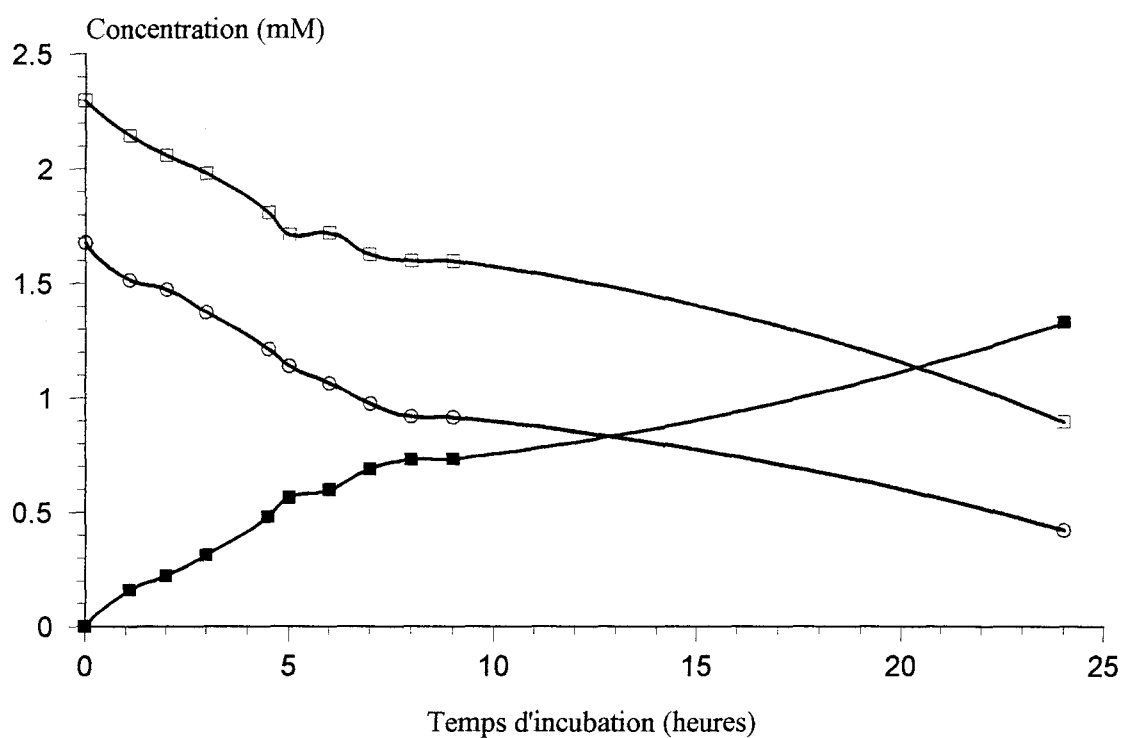


Figure 27 : Formation du lacto-N-biose en fonction du temps d'incubation.

Symbole : (■) β-D-Gal (1,3) GlcNAc, (○) galactose-1-phosphate et (□) N-acétylglucosamine

glucose contenu dans le milieu de culture est susceptible d'influencer la capacité d'incorporation du glucose.

A-Détermination des paramètres cinétiques

Cette étude a été réalisée à pH 7 et à 39°C sous les conditions décrites précédemment (cf. IV-G, page 76). La représentation de Lineweaver et Burk (Glucose incorporé = f ([Glucose]), Figure 28, page 101) a donné les résultats suivants :

$$-K_M = 9,16 \text{ mM}$$

$$-V_{\max} = 26,56 \text{ nmol de glucose incorporé/min/mg de protéine}$$

Le système de transport du glucose ne possède pas une affinité très élevée pour ce monosaccharide si on le compare à d'autres systèmes d'incorporation du glucose, comme chez *Vibrio parahaemolyticus*, le symport à Na^+ à un K_M de 0,57 mM (Sarker *et al.*, 1994). De plus, le rapport $V_{\max}/K_M$ est dix fois plus faible chez *Bifidobacterium bifidum* (2,89) que chez *Vibrio parahaemolyticus* (26,31), on peut donc considérer que le transporteur du glucose chez *Bifidobacterium bifidum* possède une affinité dix fois plus faible que celui de *Vibrio parahaemolyticus*.

B-Type de transport

La détermination du mécanisme de transport du glucose est réalisée à l'aide de différents inhibiteurs spécifiques des translocases, puis à l'aide de différents ions ainsi que des donneurs d'énergie, nous essayerons de déterminer précisément le mécanisme d'incorporation du glucose.

1-Action des inhibiteurs de translocases

Le transport du glucose est fortement inhibé (64 %) par la lasalocid (Figure 29, page 102). La lasalocid est décrite comme un inhibiteur des symports à cation. Elle agit en

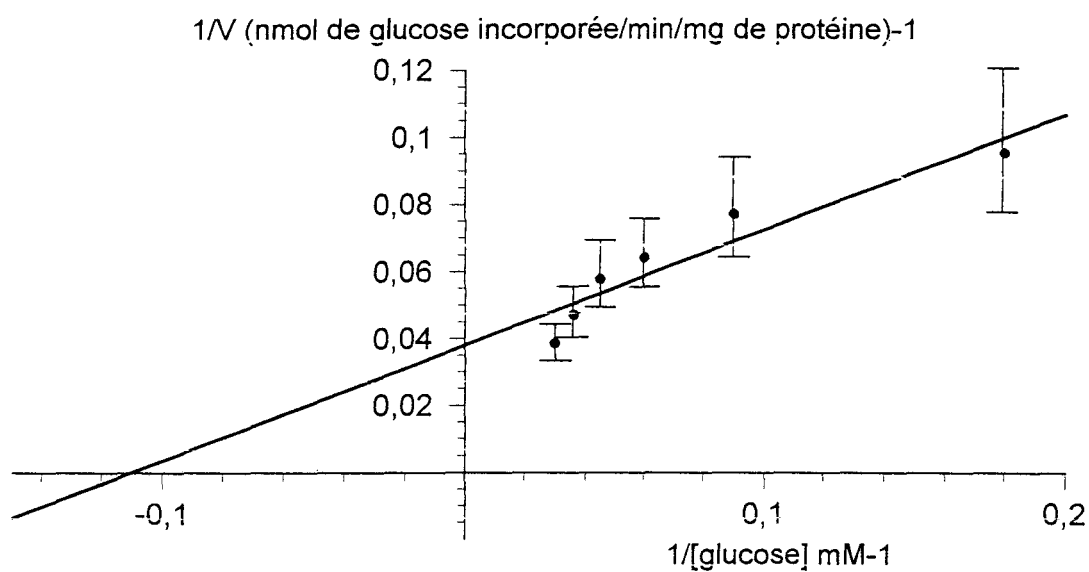


Figure 28 : Détermination des paramètres cinétiques de l'incorporation du glucose (représentation de Lineweaver et Burk). L'incorporation du glucose a été mesurée après 8 minutes d'incubation à 39°C.

introduisant une perturbation dans l'équilibre ionique qui existe de part et d'autre de la membrane. Les autres effecteurs métaboliques n'ont pas d'effet inhibiteur véritablement marqué sur l'incorporation du glucose, il en est de même pour les inhibiteurs de phosphorylation.

Chez *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082, le glucose semble donc être véhiculé à travers la membrane par un symport à cation. Nous allons donc utiliser différents ions afin de caractériser le cation cotransporté avec le glucose.

2-Influence des cations sur l'incorporation du glucose

Pour déterminer le cation cotransporté avec le glucose, nous avons testé plusieurs chlorures à deux concentrations différentes 50 et 100 mM (Tableau VIII, page 104). Les chlorures de calcium, de magnésium et sodium ont peu d'influence sur l'incorporation du glucose, par contre, les chlorures ferrique et de lithium entraînent une inhibition de la pénétration. Seul, le chlorure de potassium active la pénétration du glucose. L'incorporation du glucose a été étudiée pour des concentrations croissantes de KCl. La capacité maximale du système est atteinte pour une concentration de 40 mM (Figure 30, page 104). La courbe a une allure gaussienne, il y a une augmentation de l'incorporation du glucose pour des concentrations allant jusqu'à 40 mM. Au-delà de cette valeur, la baisse de l'incorporation peut s'expliquer soit par une osmolarité trop grande, soit par un encombrement dû aux ions potassium (ion perturbant l'association) ou encore, un déséquilibre ionique de part et d'autre de la membrane.

L'activation de l'incorporation du glucose par les ions potassium est relativement faible par rapport à celle décrite chez *Vibrio parahaemolyticus*, la quantité de glucose incorporé est multipliée par six après cinq minutes d'incubation en présence de NaCl 40 mM (Sarker *et al.*, 1994). La présence d'ions potassium dans le milieu de culture permet d'expliquer cette faible activation, après un seul lavage, il reste une faible quantité de milieu de culture avec le culot bactérien renfermant des ions potassium.

Le glucose semblerait donc être transporté par un symport à cation régulé par les ions potassium.

Tableau VIII : influence des ions sur l'incorporation du Glucose.

Sels	[Sels] mM	Incorporation (nmol/min/mg de protéine)	Incorporation (%)
Témoin	0	3,81 ± 0,2	100
CaCl ₂	50	2,89 ± 0,04	75,7
	100	2,91 ± 0,18	76,2
FeCl ₃	50	0,46 ± 0,11	12
	100	0,32 ± 0,12	8,4
KCl	50	5,33 ± 0,88	139,7
	100	3,42 ± 0,04	89,8
LiCl	50	2,09 ± 0,21	54,8
	100	1,85 ± 0,16	48,6
MgCl ₂	50	2,43 ± 0,38	63,7
	100	2,57 ± 0,18	67,4
NaCl	50	2,92 ± 0,08	76,6
	100	3 ± 0,11	78,7

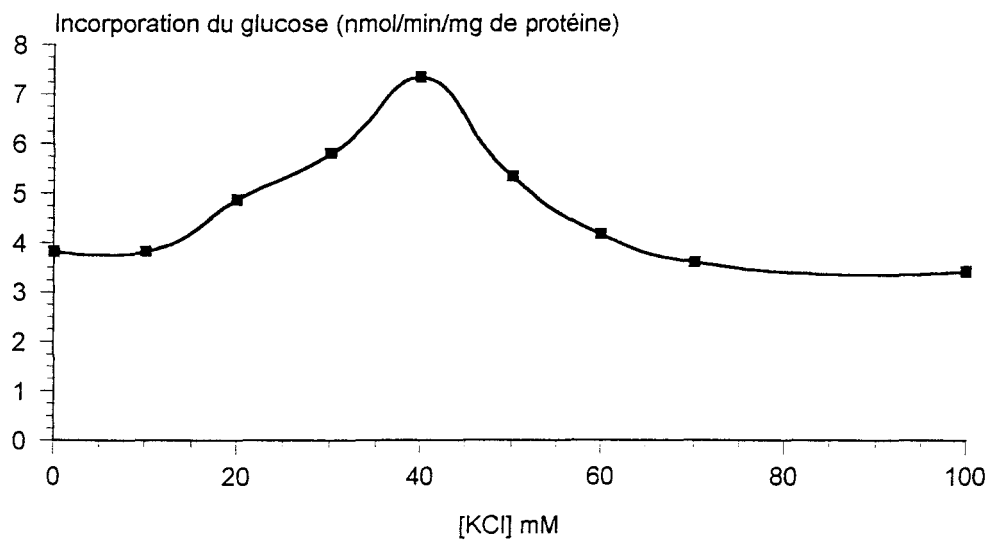


Figure 30 : Influence de la concentration en chlorure de potassium sur l'incorporation du glucose. Les prélèvements ont été effectués après 8 minutes d'incubation à 39°C.

3-Influence du donneur d'énergie

Afin d'étudier la phosphorylation du glucose chez *Bifidobacterium bifidum*, nous avons perméabilisé les membranes des bactéries dans le but d'y faire pénétrer des petites molécules (inférieures à 2000 Da). L'ajout d'ATP ou de phosphoénolpyruvate aux bactéries perméabilisées permet d'augmenter le pool intracellulaire des molécules hautement énergétiques. Nous avons utilisé *Escherichia coli* K12 JM83 comme témoin positif de l'activation d'une translocation de groupe du glucose par le phosphoénolpyruvate. Dans ce cas, la phosphorylation du glucose est multipliée par 8 en présence de phosphoénolpyruvate. Chez *Bifidobacterium bifidum*, le phosphoénolpyruvate n'a pas d'influence sur la phosphorylation du glucose (Tableau IX, page 106), le glucose ne semble pas être véhiculé par un système de la phosphotransférase. De plus la présence d'ATP ne favorise pas la phosphorylation du glucose.

4-Spécificité de transporteur

Des analogues du glucose ont été testés afin de déterminer la spécificité de la translocase à glucose. Les saccharides utilisés peuvent être classés en deux catégories (Tableau X, page 106), les activateurs (N-acétylgalactosamine, β -D-Gal (1,3) GalNAc et fructose) et les inhibiteurs (Mannose, Galactose, désoxyglucose, N-acétylglucosamine). Le lactose n'a aucune action sur l'incorporation du glucose.

La plus forte inhibition est obtenue par le 2-déoxyglucose (36 et 64 %) et la N-acétylglucosamine (58 et 54 %). La N-acétylglucosamine est efficace dès les faibles concentrations, tandis que l'inhibition du 2-déoxyglucose est plus importante à forte concentration. Pour la N-acétylglucosamine, il y a un phénomène de saturation du système de transport du glucose, cette inhibition est très efficace même à faible concentration. La présence du groupement hydroxyle en position équatoriale sur le carbone 2 n'est pas indispensable dans la reconnaissance du glucose par le transporteur. De plus, le mannose (épimère en 2 du glucose) inhibe la pénétration du glucose (27 %), cette inhibition n'est pas modifiée, même si sa concentration est multipliée par dix. Le galactose (épimère en 4 du glucose), lorsqu'il est en forte concentration, inhibent faiblement la pénétration du glucose (34 %). De plus, comme la N-acétylgalactosamine n'inhibe pas l'incorporation du glucose, la position axiale du groupement hydroxyle sur le carbone 4 est donc importante

Tableau IX : Incorporation du glucose en fonction du donneur d'énergie.

Donneur d'énergie	nmol de glucose phosphorylé/min/mg de protéine	
	<i>Bifidobacterium bifidum</i> DSM 20082	<i>Escherichia coli</i> K12 JM83
Témoin	3,49 ± 0,09	3,92 ± 0,04
ATP	4,76 ± 0,16	5,67 ± 0,07
PEP	3,14 ± 0,09	32,09 ± 0,9

Tableau X : Influence des saccharides sur l'incorporation du glucose.

Inhibiteurs	[sucre] (mg/ml)	Incorporation (nmol/min/mg de protéine)	Incorporation (%)
Témoin		3,75 ± 0,53	100
deoxyglucose	1	2,77 ± 0,7	73,8
	10	1,34 ± 0,02	35,6
N-acétylglucosamine	1	1,59 ± 0,47	42,2
	10	1,71 ± 0,29	45,7
mannose	1	2,77 ± 0,71	73,8
	10	2,71 ± 0,005	72,3
galactose	1	6,41 ± 0,91	106,9
	10	2,48 ± 0,40	66,2
lactose	1	3,95 ± 0,23	105,4
	10	4,11 ± 0,29	109,6
N-acétylgalactosamine	1	4,92 ± 0,39	131,3
	10	6,08 ± 0,57	162
Gal B (1,3) GalNAc	1	5,57 ± 0,19	148,5
	10	6,32 ± 0,014	168,6
fructose	1	12,32 ± 0,72	328,4
	10	18,02 ± 0,35	480,6

dans le phénomène de reconnaissance du glucose par son transporteur. La conformation du glucose est donc indispensable dans le mécanisme de reconnaissance du saccharide par son transporteur. Le système de transport du glucose est spécifique de ce dernier mais il doit être capable de transporter d'autre monosaccharide comme le deoxyglucose, le mannose ou la N-acétylglucosamine.

C-Composés intracellulaires formés à partir du glucose

Après trois minutes d'incubation, les composés radioactifs intracellulaires ont été déposés sur une feuille de chromatographie, afin de visualiser les différents métabolites. Trois catégories de molécules sont observées (Figure 31, page 108), l'une reste à l'origine ($R_f=0,07$), l'autre migre comme des saccharides monophosphorylés ($R_f=0,47$) et la dernière ayant un R_f de 0,23 a le même comportement que des monosaccharides diphosphorylés. Le glucose après son incorporation est rapidement converti en glucose-6-phosphate (absence de glucose intracellulaire ($R_f=0,833$) et présence de saccharides phosphorylés).

La présence de molécules ne migrant pas ($R_f=0,07$), nous laisse penser que le glucose est incorporé dans des macromolécules. De plus, ces molécules sont insensibles aux protéases, nous pouvons envisager qu'une partie du glucose incorporé, se retrouve dans le polysaccharide bactérien de *Bifidobacterium bifidum*. Ce résultat est confirmé par les études structurales du polysaccharide de l'espèce *bifidum* qui contient du rhamnose et du glucose (Veerkamp *et al.*, 1983; Habu *et al.*, 1987).

D-Discussion

A la vue des résultats obtenus, le glucose est transporté par une protéine membranaire spécifique du glucose, ayant une affinité relativement faible pour son substrat ($K_M = 9,16$ mM). Le glucose semble être incorporé par un symport à cation régulé par les ions potassium (inhibition par la lasalocid et activation par le KCl). Cette étude démontre clairement l'absence d'un système de la phosphotransférase pour le glucose comme cela a été décrit par l'équipe de Romano (Romano *et al.*, 1979). Par contre, Degnan et Macfarlane (1993) démontrent la présence d'une translocation de groupe pour le glucose

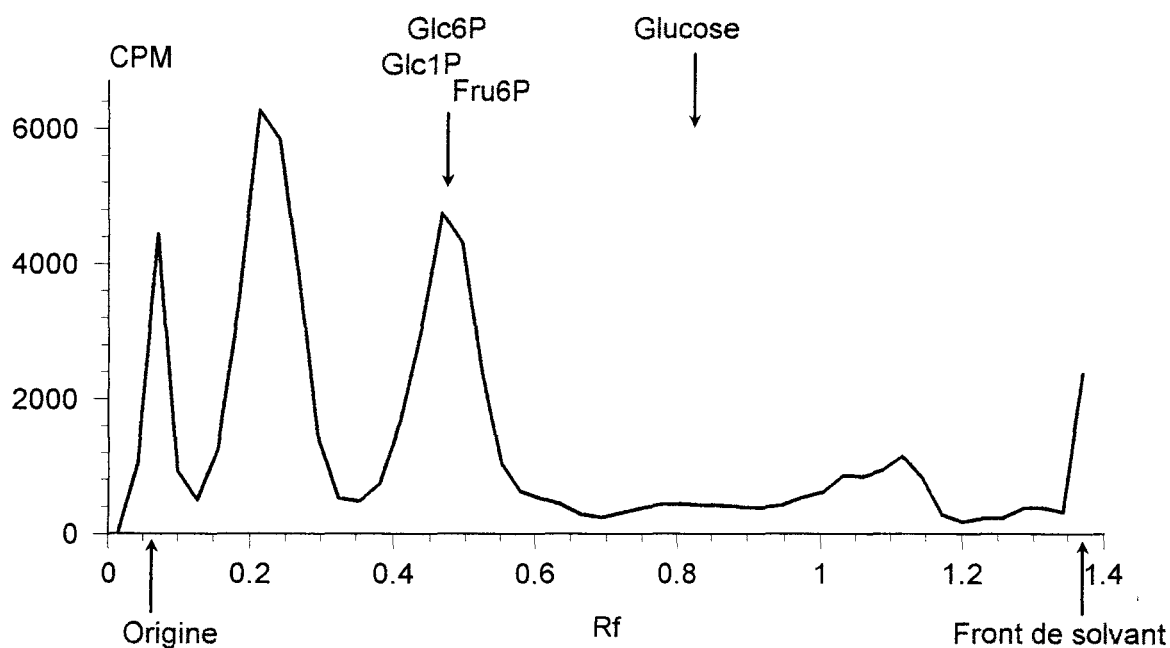


Figure 31 : Profil de migration des composés radioactifs intracellulaires après une incubation en présence de glucose. Les bifidobactéries sont incubées pendant 3 minutes en présence de glucose radioactif. Les bactéries sont lavées puis cassées aux ultrasons. Les composés intracellulaires sont séparés par chromatographie descendante sur papier. Après séchage de la feuille, des bandes horizontales de 1 cm sont découpées, puis mises à compter.

chez *Bifidobacterium breve*. La deuxième différence avec les travaux de Degnan et Macfarlane, est la capacité d'incorporation du glucose, chez *Bifidobacterium bifidum*, elle est de $3,75 \pm 0,42$ nmol/min/mg de protéine, cette valeur est 4 fois inférieure à celle du système de la phosphotransférase du glucose chez *Bifidobacterium breve* ($14,38 \pm 4,95$ nmol/min/mg de protéine).

Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer cette différence :

(i)-le transport du glucose pourrait se faire différemment selon les différentes espèces de bifidobactéries comme cela a été mis en évidence chez les lactobacilles. Dans ce dernier cas, le glucose est véhiculé, soit par un symport à proton (*Lactobacillus brevis*, Ye et Saier, 1995), soit par un système de la phosphotransférase (*Lactobacillus bulgaricus*, Hickey *et al.*, 1986).

(ii)-les différents types de transport peuvent être dépendants de la phase de croissance. Chez *Bacillus licheniformis*, le transport du glucose s'effectue par l'intermédiaire d'une translocation de groupe et par un système indépendant des phosphotransférases. Les deux mécanismes sont actifs durant la phase exponentielle, tandis que seule la translocation de groupe est efficace durant la phase stationnaire (Tangney *et al.*, 1996).

(iii)-les conditions de culture des bactéries et d'incubation lors des expériences peuvent changer le type de transport et ses paramètres cinétiques. Le transport du fructose chez *Arthrobacter pyridonilis*, s'effectue par l'intermédiaire d'une translocation de groupe et par un système de transport couplé à la respiration. La translocation de groupe est inhibée par les composés stimulant la respiration, quand les bactéries sont mises en culture en aérobiose, la translocation de groupe ne fonctionne pas (Pellicione *et al.*, 1979). De plus, de mauvaises conditions d'anaérobiose diminuent la vitesse de transport du saccharide (Franklund et Glass, 1987). Certains transporteurs sont induits et nécessitent la présence du saccharide lors de la culture des bactéries pour être exprimé majoritairement à la surface des bactéries.

IV-TRANSPORT DU LACTOSE

A-Induction

Chez *Escherichia coli*, l'utilisation du lactose met en jeu l'opéron lactose regroupant trois gènes codant pour une perméase, une β -D-galactosidase et une acyltransférase. Ce système est induit par la présence du lactose ou d'un analogue de structure comme l'IPTG. Dans ces conditions, on note une augmentation du niveau de l'activité β -D-galactosidasique d'un facteur mille. Chez *Escherichia coli*, en outre, il existe une répression catabolique par le glucose ou le galactose (Beckwith, 1987).

Dans le cadre de notre étude, nous avons essayé de voir si *Bifidobacterium bifidum* répondait de la même façon. Les résultats obtenus (Tableau XI, page 111) montrent que dans le cas de ce micro-organisme, il n'y a aucun phénomène d'induction engendré tant par le lactose que par l'IPTG. L'adaptation des bactéries à croître sur un milieu TPY + lactose ne permet que de tripler la vitesse d'incorporation du lactose et de doubler l'activité galactosidasique.

Le système impliqué dans le transport membranaire du lactose, ainsi que dans sa dégradation est constitutif.

B-Détermination des paramètres cinétiques

Les paramètres cinétiques de la pénétration du lactose ont été étudiés à pH 7 et 39°C et déterminés grâce à la représentation graphique de Lineweaver et Burk (Figure 32, page 111), ils s'établissent comme suit :

$$-K_M = 2,6 \text{ mM}$$

$$-V_{\max} = 12,11 \text{ nmol de lactose incorporé/min/mg de protéine}$$

L'affinité du système de transport du lactose est trois fois supérieure à celle de la translocase à glucose. Par contre sa vitesse maximale est inférieure. Ces valeurs sont voisines de celles observées chez *Citrobacter freundii* ($K_M=1,1 \text{ mM}$, $V_{\max}=12 \text{ nmol/min/mg de protéine}$) qui véhicule le lactose par un symport à proton inductible (Okazaki *et al.*, 1994). L'étude des rapports de $V_{\max}/K_M$, nous montre que le système de transport du lactose de *Bifidobacterium bifidum* (4,66) est deux fois moins performant que celui de *Citrobacter freundii* (10,9). Par contre, il est deux fois plus performant que celui décrit pour le glucose.

Tableau XI : Activité β -D-galactosidasique et incorporation du lactose en fonction des conditions de culture.

Milieu de culture	Activité β -D-galactosidasique (U/mg de protéine)	Lactose incorporé (nmol/min/mg de protéine)
TPY + Glc (5g/L)	surageant ^a : $1,75 \pm 0,32$ culot ^b : $0,20 \pm 0,08$	$1,01 \pm 0,024$
TPY + Glc (5g/L) + IPTG (1mM)	surageant ^a : $1,64 \pm 0,48$ culot ^b : $0,22 \pm 0,06$	$1,26 \pm 0,25$
TPY + Lactose (10g/L)	surageant ^a : $2,58 \pm 0,21$ culot ^b : $0,24 \pm 0,07$	$3,13 \pm 0,67$

^a Activité β -D-galactosidasique du surageant après traitement des bifidobactéries aux ultrasons.

^b Activité β -D-galactosidasique du culot après traitement des bifidobactéries aux ultrasons.

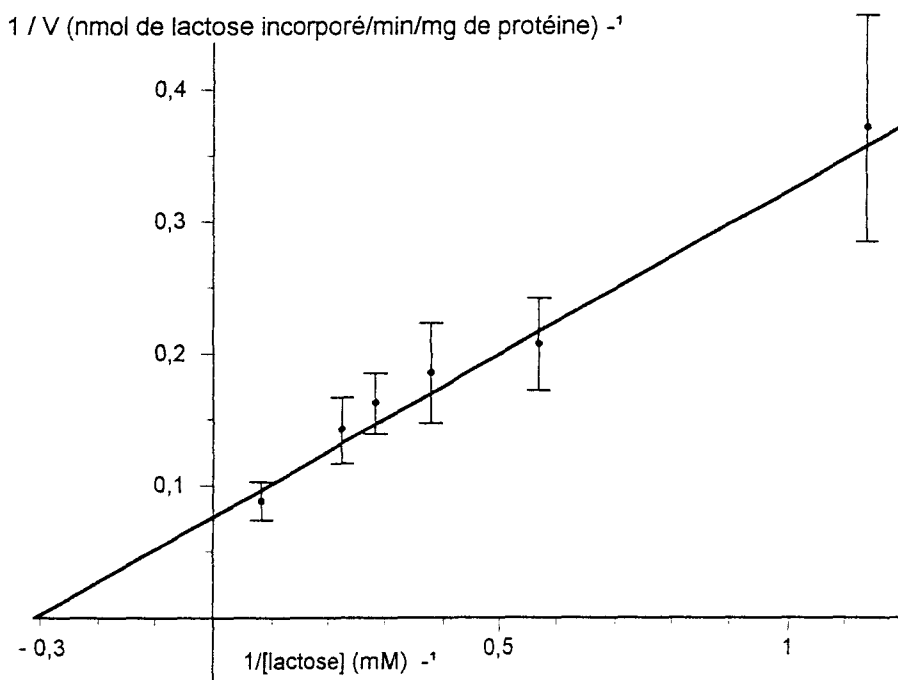


Figure 32 : Détermination des paramètres cinétiques de l'incorporation du lactose (représentation de Lineweaver et Burk). L'incorporation du lactose a été mesurée après 8 minutes d'incubation à 39°C.

C-Hydrolyse du lactose intracellulaire après incorporation

Bifidobacterium bifidum possède une forte activité β -D-galactosidasique associée aux enveloppes de la bactérie. Cette enzyme se retrouve en faible quantité dans le milieu extracellulaire où sa concentration augmente surtout en fin de culture. La radioactivité incorporée par la bactérie peut en fait provenir soit du lactose ($1\text{-}^{14}\text{C}$ [glucose]) soit du glucose résultant de l'hydrolyse extracellulaire du lactose. Pour connaître quel était le mécanisme, nous avons étudié les molécules radiomarquées intracellulaires obtenues après 3 minutes d'incubation (Figure 33, page 113). Comme pour le glucose, nous pouvons mettre en évidence la présence de molécules radioactives à l'origine ($R_f=0,07$) ainsi que celles ayant un R_f de 0,23. Par contre, il n'y a pas de structures migrant comme des monosaccharides phosphorylés ($R_f=0,466$). De plus, après l'incubation, une faible quantité de lactose ($R_f=0,663$) et de glucose intracellulaire ($R_f=0,833$) est détectable.

Le lactose, juste après son incorporation dans le milieu intracellulaire, est hydrolysé pour donner du glucose et du galactose. *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082 possède donc deux systèmes de transport distincts pour le glucose et pour le lactose. Dans ce cas, l'absence de glucose-6-phosphate, premier composé formé à partir du glucose lors de son utilisation par le "shunt bifide", nous laisse supposer que le glucose-1-phosphate servira à convertir le galactose en glucose par la voie de Leloir ou la voie de la pyrophosphorylase afin que celui-ci soit métabolisé. Il y aurait donc de ce fait une diminution du pool intracellulaire du glucose-1-phosphate libre.

D-Type de transport

1-Action des inhibiteurs de translocases

Plusieurs inhibiteurs de translocases ont été utilisés pour déterminer le mécanisme de transport (Figure 34, page 114). Aucune inhibition du transport membranaire du lactose n'a pu être caractérisée par l'utilisation d'inhibiteur de transport d'électron (ménadione) ou de composés réagissant avec le fer (*o*-phénanthroline).

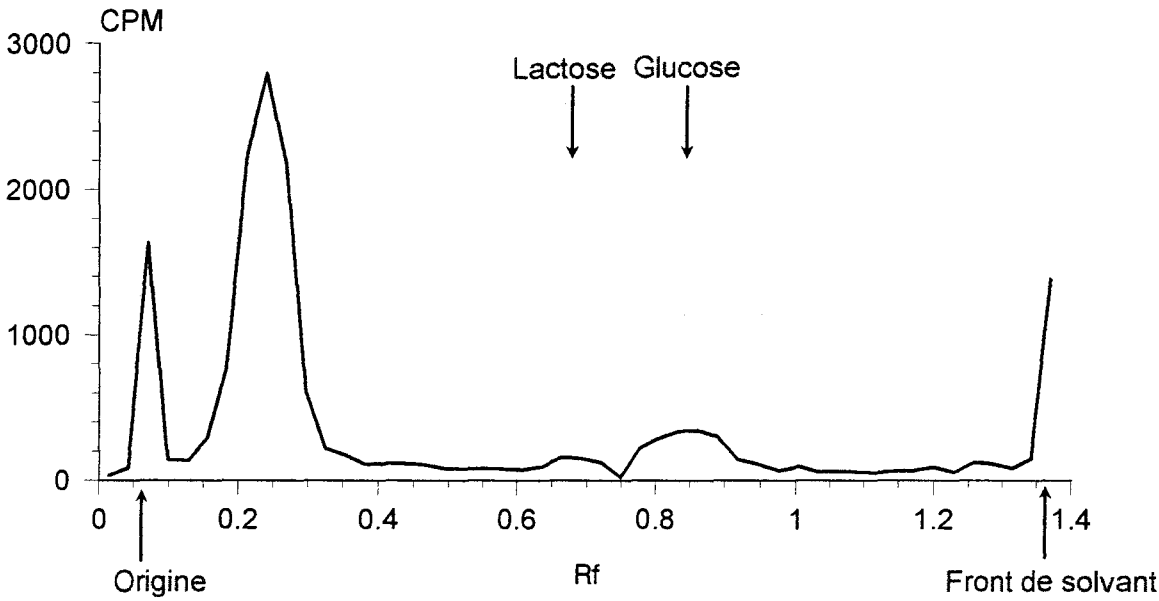


Figure 33 : Chromatogramme des composés radioactifs intracellulaires après une incubation en présence de lactose. Les bifidobactéries sont incubées pendant 3 minutes en présence de lactose radioactif. Les bactéries sont lavées puis cassées aux ultrasons. Les composés intracellulaires sont séparés par chromatographie descendante sur papier. Après séchage de la feuille, des bandes horizontales de 1 cm sont découpées, puis mises à compter.

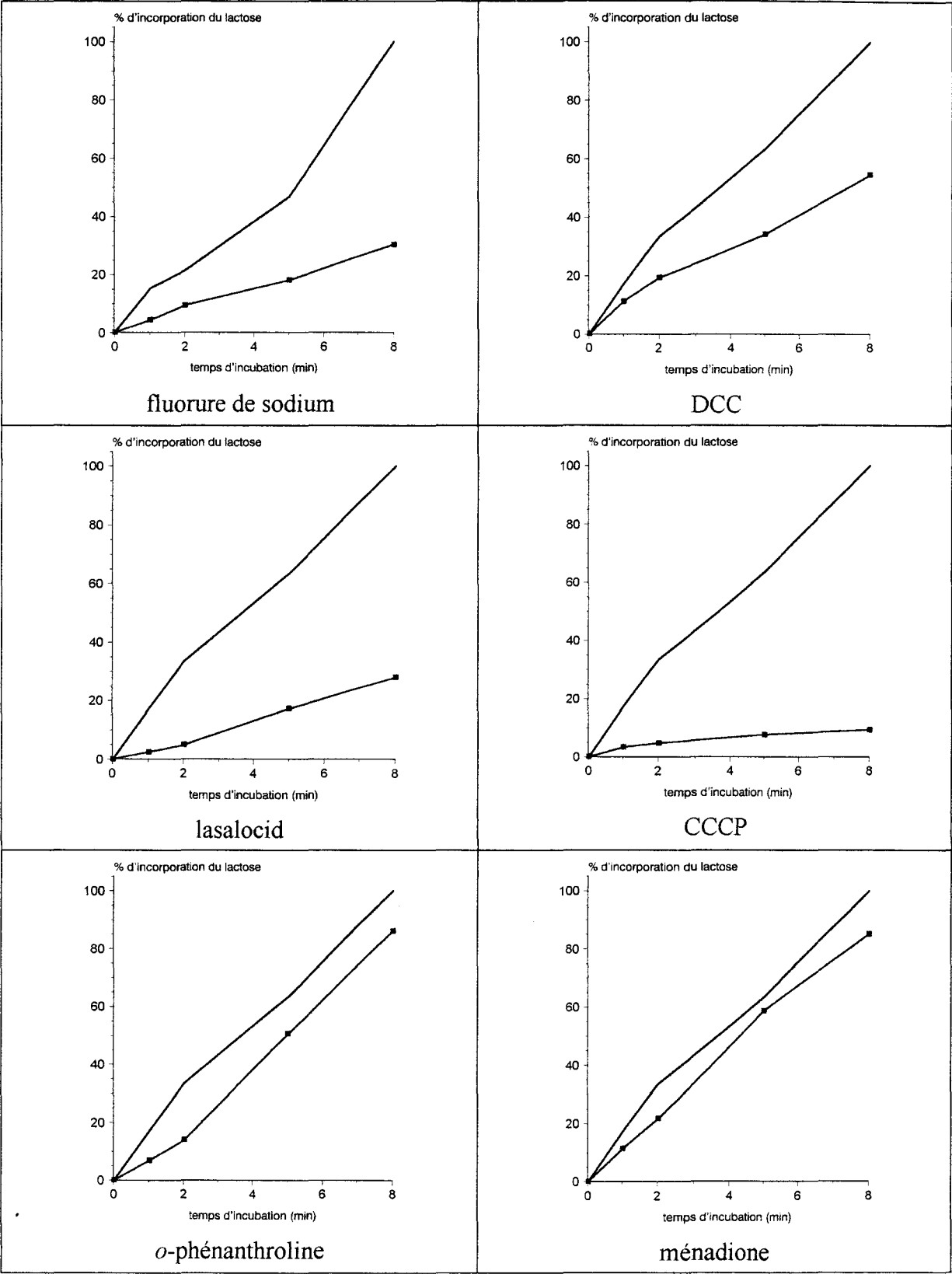


Figure 34 : Influence des inhibiteurs de translocases sur l'incorporation du lactose.
Activité en présence (■) et en absence (—) d'effecteur

Les molécules inhibant la synthèse d'ATP ou les phénomènes de phospho-déphosphorylation entraînent une diminution de la capacité d'incorporation du lactose. Cette diminution est de l'ordre de 45% pour le DCC et de 70% pour le fluorure de sodium.

Le transport du lactose est donc sensible aux inhibiteurs de phosphorylation, il nous a paru intéressant d'étudier l'influence de l'ATP et du phosphoénolpyruvate sur le transport et la phosphorylation du lactose. L'étude des réactions de phosphorylation du lactose n'est pas complète, du fait du seul marquage du glucose, aucune information n'est obtenue concernant le devenir du galactose. Les résultats obtenus (Tableau XII, page 117) montrent que la phosphorylation du glucose n'est pas favorisée ni en présence d'ATP, ni en présence de phosphoénolpyruvate. Nous retrouvons en cela les résultats déjà décrits pour le transport et l'utilisation du glucose. Le phosphoénolpyruvate n'a pas d'influence sur la phosphorylation du lactose, ceci confirme l'absence d'une translocation de groupe.

L'inhibition de la formation de l'ATP par le DCC doit entraîner une baisse du pool d'ATP intracellulaire qui est nécessaire à la phosphorylation du glucose et du galactose (De Vries *et al.*, 1967). De plus, le DCC est capable d'inhiber les symports à proton (Nalecz *et al.*, 1986). Le fluorure de sodium inhibe les mécanismes de phospho-déphosphorylation et les translocations de groupe. Enfin chez *Bifidobacterium bifidum*, l'action du fluorure de sodium se situe plus au niveau de la formation de l'ATP intracellulaire qu'au niveau du transport proprement dit.

Nous avons caractérisé une inhibition élevée du transport du lactose en utilisant soit la lasalocid (inhibition de l'ordre de 70%) soit le CCCP qui est un inhibiteur des symports à proton (inhibition de l'ordre de 90%). Comme la lasalocid inhibe le transport du glucose et que ce dernier a été défini comme un cotransport à cation, nous avons testé d'une part l'action de différents cations sur l'activité du transporteur. Les ions sélectionnés (Na^+ , K^+ et Li^+) n'ont pas entraîné de modification de l'incorporation. D'autre part, Chow et Russel (1990) ont démontré que la lasalocid était capable de diminuer la capacité d'incorporation des symports à proton.

L'addition du CCCP provoque une dissipation du gradient de protons au travers de la membrane, entraînant ainsi une inhibition des symports à proton.

Par conséquent, le transport du lactose chez *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082 est en faveur d'un symport à proton.

2-Spécificité de transporteur

L'incorporation du lactose chez *Bifidobacterium bifidum* est peu influencée par le thiodigalactoside qui est un analogue structural non métabolisable du lactose, ainsi que par le β -D-Gal (1,3) GalNAc), le galactose et le mélibiose (Tableau XIII, page 117). Le symport à proton est donc très spécifique du lactose, et renforce donc son originalité car chez de nombreuses bactéries, le système de transport du lactose permet de véhiculer d'autres galactosides. Nous pouvons aussi noter l'augmentation de l'incorporation du lactose en présence de la N-acétylglucosamine et surtout du fructose.

Le glucose n'a aucune action sur l'incorporation du lactose, ceci confirme donc bien la présence de deux systèmes de transport différents et indépendants. Il n'y a donc pas de répression de l'incorporation du lactose par le glucose comme cela a été décrit chez *Escherichia coli* (Saier, 1996).

E-Discussion

Comme l'activité β -D-galactosidasique est aussi retrouvée dans le milieu extracellulaire (certes en très faible quantité), on peut envisager que le lactose puisse être hydrolysé à l'extérieur de la bactérie et le glucose ainsi obtenu peut pénétrer dans la bifidobactérie par le mécanisme que nous avons décrit. Cependant le glucose n'influence pas l'incorporation du lactose (Tableau XIII, page 117) et de plus, les profils des composés radiomarqués intracellulaires sont différents de ceux obtenus pour le glucose. Dans ces conditions, nous pouvons affirmer que le lactose pénètre bien dans la bactérie *via* son propre système de transport.

Le lactose serait donc incorporé en tant que disaccharide dans *Bifidobacterium bifidum* et hydrolysé par la β -D-galactosidase intracellulaire pour donner du glucose et du galactose. Le glucose est ensuite phosphorylé par la glucokinase et converti en glucose-6-phosphate pour rejoindre le "shunt bifide". Le galactose, lui, est phosphorylé par la galactokinase et ensuite converti en glucose-1-phosphate via la voie de Leloir ou la voie de la pyrophosphorolyse.

Le transport du lactose est inhibé par quatre effecteurs de translocase. Nous avons démontré qu'un système de la phosphotransférase du lactose et un symport à cation étaient

Tableau XII : Influence de l'ATP et du phosphoénolpyruvate sur la phosphorylation du lactose.

Donneur d'énergie	nmol de sucre phosphorylé/min/mg de protéine	
	<i>Bifidobacterium bifidum</i> lactose	<i>Bifidobacterium bifidum</i> glucose
Témoin	2,87 ± 0,07	3,49 ± 0,09
ATP	2,13 ± 0,33	4,76 ± 0,16
PEP	1,95 ± 0,26	3,14 ± 0,09

Tableau XIII : Influence des saccharides sur l'incorporation du lactose.

Inhibiteurs	[sucre] (mg/ml)	Incorporation (nmol/min/mg de protéine)	Incorporation (%)
Témoin		3,13 ± 0,28	100
thiodigalactoside	1	3,42 ± 0,25	109,5
	10	2,37 ± 0,22	75,7
Gal β (1,3) GalNAc	1	3,4 ± 0,13	108,9
	10	2,76 ± 0,35	88,3
mélibiose	1	3,08 ± 0,2	98,4
galactose	1	3,37 ± 0,05	107,8
	10	2,54 ± 0,34	81,3
glucose	1	3,24 ± 0,48	103,7
	10	3,09 ± 0,29	98,84
N-acétylgalactosamine	1	4 ± 0,72	128
	10	5,15 ± 0,38	164,8
N-acétylglucosamine	1	7,14 ± 0,28	228,3
	10	7,45 ± 1,33	238,5
.. fructose	1	16,61 ± 0,43	531,5
	10	18,09 ± 1,54	578,9

peu vraisemblables avec les résultats obtenus. Seul, le mécanisme de transport par un symport à proton est à envisager chez *Bifidobacterium bifidum*.

Si le lactose est véhiculé par un symport à proton, *Bifidobacterium bifidum* doit donc générer un gradient de proton de part et d'autre de la membrane. Dans la littérature, deux systèmes de génération de ce gradient de protons sont décrits chez les bactéries anaérobies (Figure 35, page 119). Le système majeur est l'ATPase membranaire qui permet d'expulser les protons de la bactérie. Ce mécanisme nécessite l'hydrolyse d'une molécule d'ATP par proton expulsé (West et Mitchell, 1974). Un autre mécanisme met en jeu un symport à proton permettant l'expulsion des différents métabolites tels que le lactate ou l'acétate associé à un proton (ten Brink et Konings, 1986). L'expulsion de ces métabolites permet de produire un gradient de proton à travers la membrane et d'éviter l'hydrolyse d'une molécule d'ATP. Pour les bifidobactéries, ten Brink et Konings (1986) ont calculé que, théoriquement, pour une molécule de glucose, la quantité d'ATP générée serait de 3,75 molécules au lieu de 2,5. Ainsi le gain énergétique approcherait les 50%. Le haut pouvoir inhibiteur du CCCP sur l'incorporation du lactose résulterait du fait que cette molécule réagirait à la fois au niveau de l'entrée du saccharide et sur la régulation de la concentration intracellulaire de proton.

V-TRANSPORT DU GALACTOSE

A-Induction

La capacité d'incorporation du galactose est peu influencée quelque soit le saccharide utilisé lors de la culture. Ainsi, en milieu TPY + galactose, la vitesse d'incorporation est de $2,86 \pm 0,15$ nmol/min/mg de protéine, alors qu'en TPY + lactose, elle est de $4,03 \pm 1,4$ nmol/min/mg de protéine. Cette légère augmentation peut s'expliquer par le fait que :

1-Nous avons précédemment démontré que le galactose était susceptible d'interférer avec le lactose au niveau de sa perméase (20% d'inhibition) pour de forte concentration.

2-Nous avons, en outre, démontré que l'incorporation du lactose était multipliée par trois quand le milieu TPY renfermait du lactose (cf. IV-A, page 109). Il est donc normal

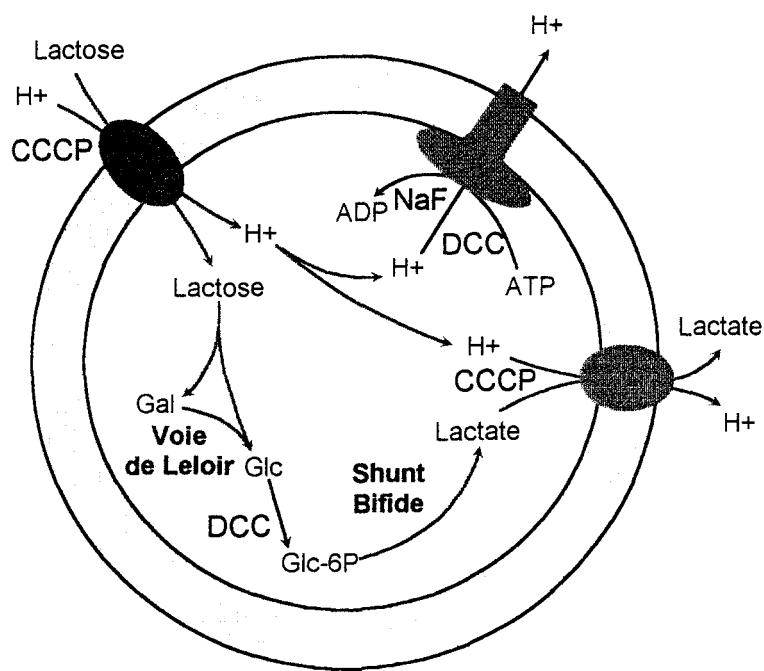


Figure 35 : Représentation schématique du mécanisme de transport du lactose et de la formation du gradient de protons.

qu'en milieu TPY + lactose, nous obtenions une augmentation de l'incorporation du galactose.

Dans ces conditions, on peut imaginer que le galactose va être transporté à la fois par son propre système et celui du lactose.

B-Détermination des paramètres cinétiques

L'incorporation du galactose est faible ($4,03 \pm 1,4$ nmol de galactose incorporé/min/mg de protéine) et de plus, elle est constante pour des temps compris entre 1 et 8 minutes. Pour des concentrations de galactose comprises entre 2 et 30 mM, le système de transport n'est pas saturable (Figure 36, page 121).

Ces résultats permettent d'envisager l'absence d'un système de transport actif répondant aux règles des enzymes Michaeliennes.

C-Incorporation du galactose

Lors d'une incubation en présence de galactose radioactif, un seul composé radioactif peut être visualisé après chromatographie descendante sur papier (Figure 37, page 121). Ce composé possède un R_f identique à celui des monosaccharides neutres ($R_f=0,84$). Le galactose pénètre au niveau intracellulaire sans qu'il soit phosphorylé, on note sur le chromatogramme l'absence de tout composé phosphorylé ($R_f=0,466$). De ces observations on peut conclure que la galactokinase ne possède pas une activité très importante chez *Bifidobacterium bifidum* et que le galactose ne se retrouve pas incorporé directement ou indirectement au niveau des macromolécules.

D-Activité galactokinase

L'activité de la galactokinase est 20 fois inférieure à la glucokinase (Tableau XIV, page 123). Ce résultat concorde avec la faible capacité qu'ont les bifidobactéries à incorporer le galactose, et l'absence de saccharides phosphorylés intracellulaires (cf V-C,

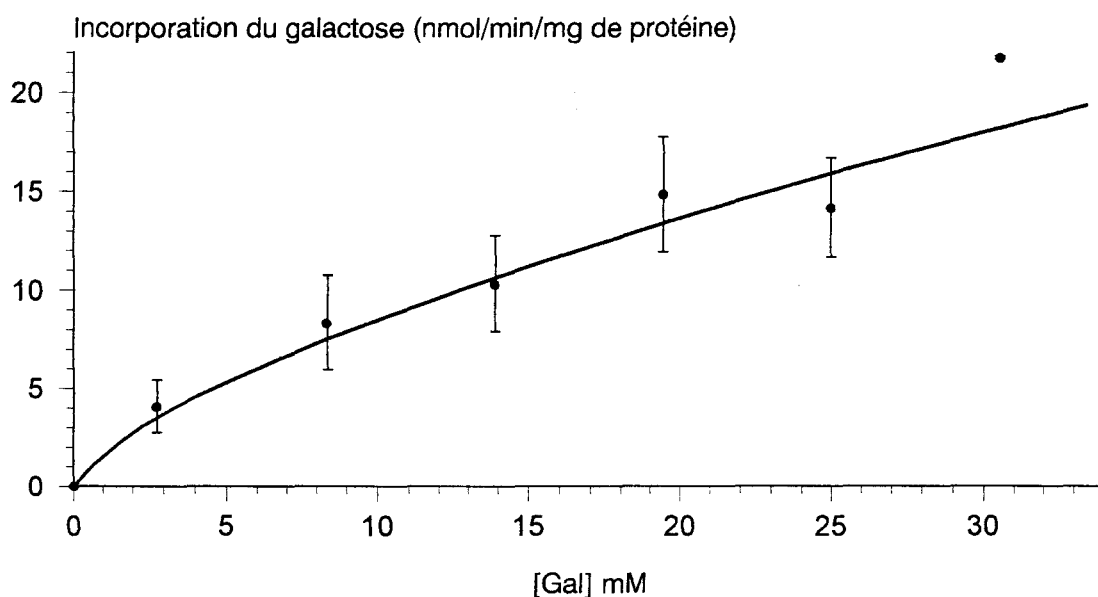


Figure 36 : Incorporation du galactose.

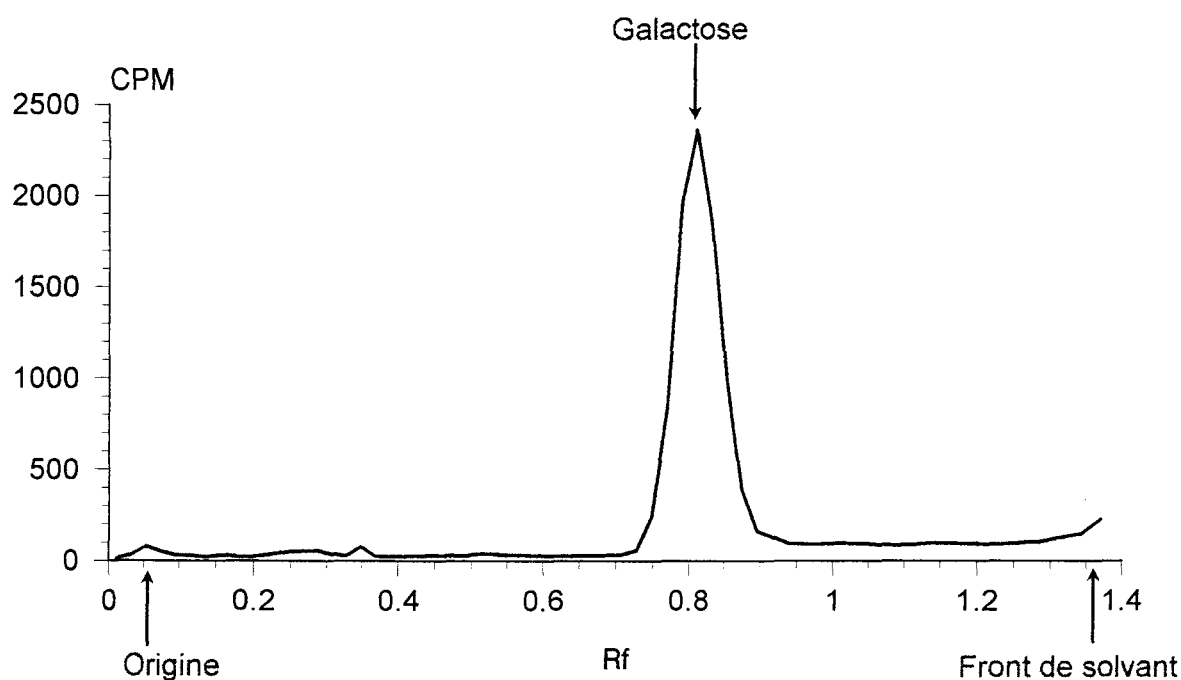


Figure 37 : Profil de migration des composés radioactifs intracellulaires après une incubation en présence de galactose. Les bifidobactéries sont incubées pendant 3 minutes en présence de lactose radioactif. Les bactéries sont lavées puis cassées aux ultrasons. Les composés intracellulaires sont séparés par chromatographie descendante sur papier. Après séchage de la feuille, des bandes horizontales de 1 cm sont découpées, puis mises à compter.

page 120). Les bifidobactéries ont une plus grande capacité de phosphorylation du glucose que du galactose.

L'ajout d'ATP permet de multiplier par 4 l'activité de la galactokinase de *Bifidobacterium bifidum* perméabilisé. La galactokinase de *Bifidobacterium bifidum* est donc ATP-dépendante.

E-Mécanisme de transport

Les inhibiteurs des translocases que nous avons utilisés, n'ont eu aucun effet sur l'incorporation du galactose (Tableau XV, page 123). Le galactose n'est donc pas véhiculé par un gradient de cation ou de proton. Le système de transport du galactose ne nécessite pas de composés possédant des liaisons riches en énergie tel que l'ATP ou le phosphoénolpyruvate.

Le galactose semble être transporté par un mécanisme de diffusion au travers de la membrane de *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082.

F-Discussion

Le transport du galactose semble s'effectuer par un mécanisme de diffusion, car il n'est pas inhibé par les différents inhibiteurs de translocases et il ne présente pas de phénomène de saturation dans les conditions que nous avons utilisées. De plus, sa vitesse d'incorporation est très faible par rapport aux autres saccharides décrits précédemment et elle est constante dans les 8 premières minutes d'incorporation. Deux hypothèses sont envisageables :

- soit que le galactose passe au travers de la membrane par simple diffusion. Ce mécanisme est peu probable car seuls les ions et le glycérol sont véhiculés de cette manière chez les bactéries.

- soit que les concentrations de galactose utilisées ne sont pas assez importantes pour obtenir le phénomène de saturation. Lors de l'étude de l'incorporation du galactose nous avons utilisé des concentrations de galactose équivalentes à 33 mM, sachant que pour le lactose, nous arrivions à saturation pour une concentration de 5 mM ($K_M=2,6$ mM) et pour le glucose de 20 mM ($K_M=9,16$ mM). La perméase qui serait responsable, dans ce

Tableau VIX : Action de l'ATP ou du phosphoénolpyruvate sur la phosphorylation du galactose.

Donneur d'énergie	nmol de sucre phosphorylé/min/mg de protéine	
	<i>Bifidobacterium bifidum</i> galactose	<i>Bifidobacterium bifidum</i> glucose
Témoin	0,175 ± 0,013	3,49 ± 0,09
ATP	0,644 ± 0,081	4,76 ± 0,16
PEP	0,288 ± 0,022	3,14 ± 0,09

Tableau XV : Incorporation du galactose en fonction des inhibiteurs de translocases.

Inhibiteurs	Incorporation (nmol/min/mg de protéine)	Incorporation (%)
contrôle	4,03 ± 1,4	100
NaF	4,1 ± 0,88	101,7
éthanol	1,51 ± 0,50	100
Lasalocid	2,07 ± 0,18	137
DCC	1,66 ± 0,27	109,7
CCCP	1,41 ± 0,3	93,3
Ménadione	1,1 ± 0,31	73,1
<i>o</i> -phénanthroline	1,22 ± 0,29	80,8

cas, de la pénétration du galactose, serait peu affine pour son substrat et posséderait un K_M élevé.

La pénétration du galactose doit être régulée par un équilibre entre la concentration du galactose extracellulaire et intracellulaire, et la phosphorylation de ce dernier permet de déplacer l'équilibre vers une entrée de galactose. Le galactose-1-phosphate qui en résulte, est converti ensuite en glucose-1-phosphate via la voie de Leloir ou la voie de la pyrophosphorylation et sera métabolisé via le "shunt bifide" pour fournir de l'ATP. Ces deux voies se mettent en action durant des phases différentes de la croissance. La voie de Leloir est active durant la phase exponentielle, tandis que la voie de la pyrophosphorylase s'établit durant la phase stationnaire (Lee *et al.*, 1980b).

L'activité de la galactokinase est augmentée en présence d'ATP. Lors du métabolisme du galactose par le "shunt bifide", il y a production d'ATP qui pourra favoriser la phosphorylation du galactose et donc augmenter l'incorporation du galactose. Nous sommes donc en présence d'un phénomène d'activation indirecte de l'incorporation du galactose par l'ATP (Figure 38, page 125).

VI-TRANSPORT DU FRUCTOSE

A-Induction

Les bifidobactéries mises en culture en TPY + glucose ont une capacité d'incorporation de $30,1 \pm 0,63$ nmol de fructose/min/mg de protéine, cette capacité n'est pas augmentée, lors de la croissance de *Bifidobacterium bifidum* en milieu TPY + fructose ($26,67 \pm 2,92$ nmol de fructose/min/mg de protéine). Le système de transport du fructose n'est pas induit par son substrat, de plus, la capacité d'incorporation est relativement constante quelque soit le saccharide utilisé dans le milieu TPY.

B-Mécanisme du transport

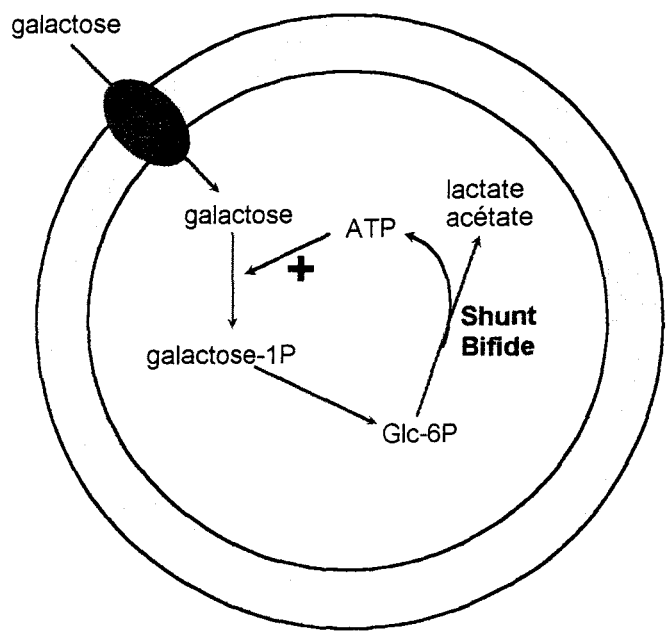


Figure 38 : Représentation schématique du système de transport du galactose.

La capacité d'incorporation du fructose est la plus élevée des saccharides étudiés. Elle est dix fois supérieure à celle du glucose (3,75 nmol/min/mg de protéine) et à celle du lactose (3,13 nmol/min/mg de protéine).

1-Action des inhibiteurs de translocase

Pour déterminer le type de transport du fructose, nous avons utilisé des effecteurs permettant d'inhiber un mécanisme de transport défini (Figure 39, page 127). La ménadione (action sur les transports d'électrons) et l'*o*-phénanthroline (action sur les composés réagissant avec le fer) n'inhibent pas l'incorporation du fructose. Le DCC (inhibiteur de la synthèse de l'ATP) augmente l'incorporation du fructose d'un facteur de 1,7. Le fluorure de sodium (action au niveau des phosphorylations), le CCCP (inhibition des symports à proton) et la lasalocid (inhibiteur des symports à cation) inhibent respectivement la pénétration du fructose de 56, 45 et 70 %.

A la vue de ces résultats, nous pouvons supposer que le fructose peut être véhiculé par trois mécanismes de transport différents :

- une translocation de groupe (inhibition par le fluorure de sodium)
- un symport à cation (inhibition par la lasalocid)
- un symport à proton (inhibition par le CCCP)

Pour déterminer le mécanisme exact du transport du fructose, nous allons étudier le comportement de cette translocase vis-à-vis de composés riches en énergie et de cations.

2-Influence de l'ATP et du phosphoénolpyruvate

La phosphorylation du fructose se réalise avec une vitesse élevée, la fructokinase est 4 fois plus active que la glucokinase et 80 fois supérieure à l'activité de la galactokinase. Cette activité est en corrélation avec la capacité à incorporer le fructose. L'ajout d'ATP et de phosphoénolpyruvate provoque une diminution de la phosphorylation du fructose de plus de 50% (Tableau XVI, page 129). Le comportement vis-à-vis de l'ATP permet d'expliquer l'augmentation du transport du fructose en présence de DCC. Cette molécule mobilise le pool d'ATP intracellulaire et diminue de ce fait les possibilités de phosphorylation. Il y a dans ces conditions, un déséquilibre énergétique qui serait

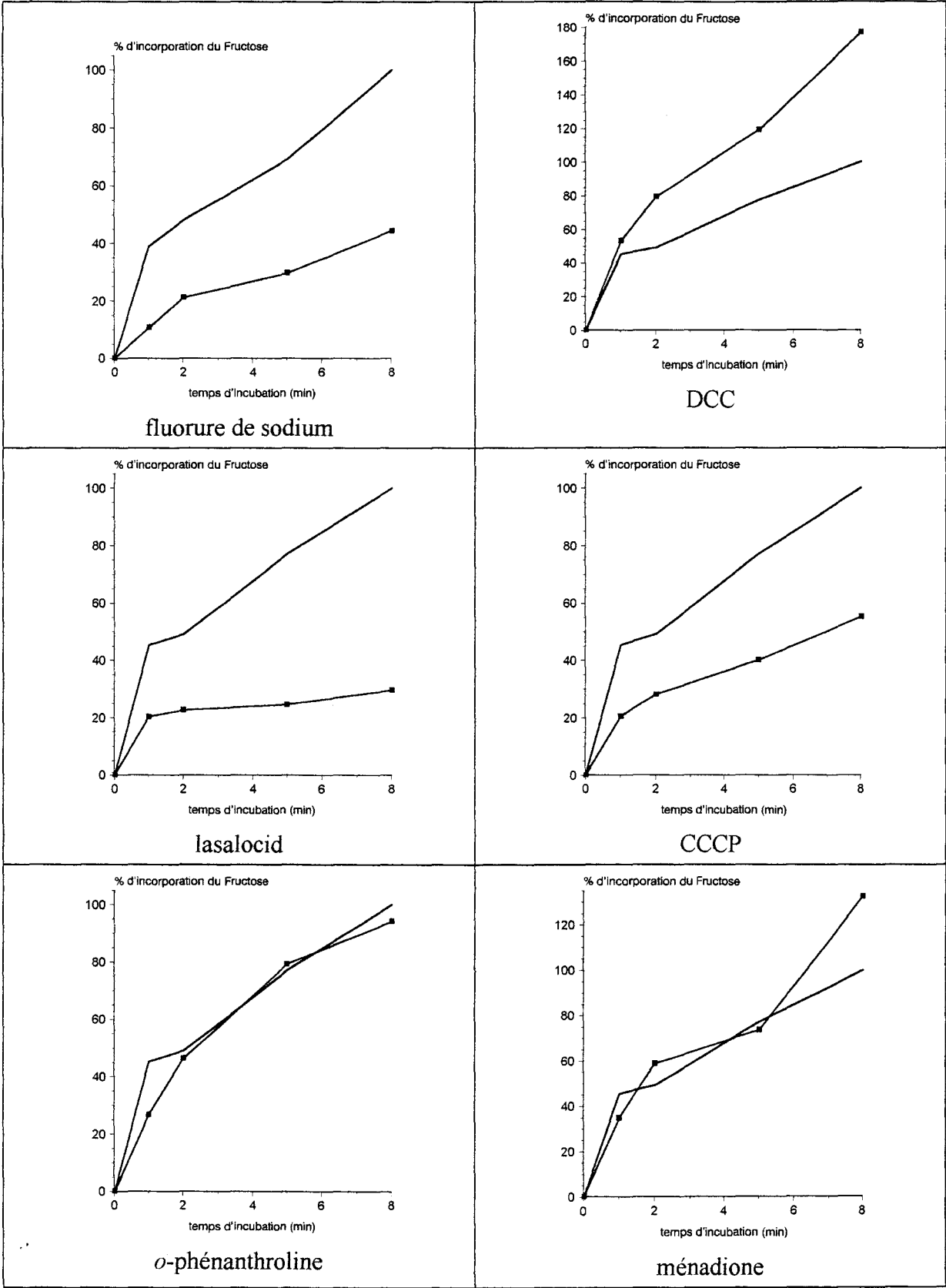


Figure 39 : Influence des inhibiteurs de translocases sur l'incorporation du fructose.
Activité en présence (■) et en absence (—) d'effecteur

compensé par une pénétration accrue de fructose en vue de renouveler le pool d'ATP intracellulaire par l'intermédiaire du "shunt bifide".

Le fructose ne serait donc pas transporté par un système de la phosphotransférase mais par un symport qu'il reste à définir.

3-Influence des sels

Le transport du fructose étant inhibé par la lasalocid, nous avons étudié l'influence des principaux ions véhiculés par les symports à cation, sur la capacité d'incorporation du fructose (Tableau XVII, page 129). Les ions potassium ou lithium n'activent pas la pénétration du fructose, et le chlorure de sodium quant à lui, provoque une diminution de la pénétration du fructose. On ne peut pas, dans ces conditions évoquer le transport du fructose par un symport à cation. La lasalocid, définie comme inhibiteur des symports à cation, peut aussi inhiber de manière non spécifique les symports à proton (Chow et Russel, 1990). Cette action secondaire expliquerait les résultats obtenus lors de l'utilisation de cette molécule.

4-Spécificité de transporteur

Le transport du fructose est inhibé par l'ajout de glucose dans le tampon d'incubation (Tableau XVIII, page 130). Les N-acétylhexosamines et le lactose n'ont aucune incidence sur l'incorporation du fructose. Bien que le fructose soit l'isomère de fonction du glucose, il n'existe que peu d'homologie structurale avec ce dernier et il est difficile d'expliquer le phénomène d'inhibition. La présence d'un groupement acétyle entraîne une non reconnaissance du substrat. La translocase du fructose est très spécifique du saccharide transporté.

C-Incorporation du fructose

Après l'incorporation cellulaire du fructose, nous pouvons dénombrer six familles de composés (Figure 40, page 130), quatre sont facilement identifiables, l'un restant à

Tableau XVI : Influence de l'ATP ou du phosphoénolpyruvate sur la phosphorylation du fructose.

Donneur d'énergie	nmol de sucre phosphorylé/min/mg de protéine	
	<i>Bifidobacterium bifidum</i> fructose	<i>Bifidobacterium bifidum</i> glucose
Témoin	15,82 ± 0,53	3,49 ± 0,09
ATP	6,44 ± 0,21	4,76 ± 0,16
PEP	6,74 ± 0,22	3,14 ± 0,09

Tableau XVII : influence des ions sur l'incorporation du fructose

Sels	[Sels] mM	Incorporation (nmol/min/mg de protéine)	Incorporation (%)
Témoin	0	26,73 ± 2,92	100
KCl	50	26,33 ± 0,89	98,7
	100	23,07 ± 0,81	86,5
LiCl	50	21,23 ± 0,89	79,6
	100	25,42 ± 0,67	95,3
NaCl	50	18,75 ± 0,52	70,3
	100	12,67 ± 0,46	47,5

Tableau XVIII : Influence des saccharides sur l'incorporation du fructose

Inhibiteurs	[sucre] (mg/ml)	Incorporation (nmol/min/mg de protéine)	Incorporation (%)
Témoin		26,67 ± 2,92	100
lactose	1	22,65 ± 0,23	84,9
	10	25,82 ± 1,46	96,6
glucose	1	18,7 ± 2,74	70,1
	10	12,24 ± 1,36	45,9
N-acétylglucosamine	1	22,62 ± 1,26	84,8
	10	23,98 ± 0,35	89,9
N-acétylgalactosamine	1	27,69 ± 0,95	103,8
	10	23,76 ± 0,74	89,1

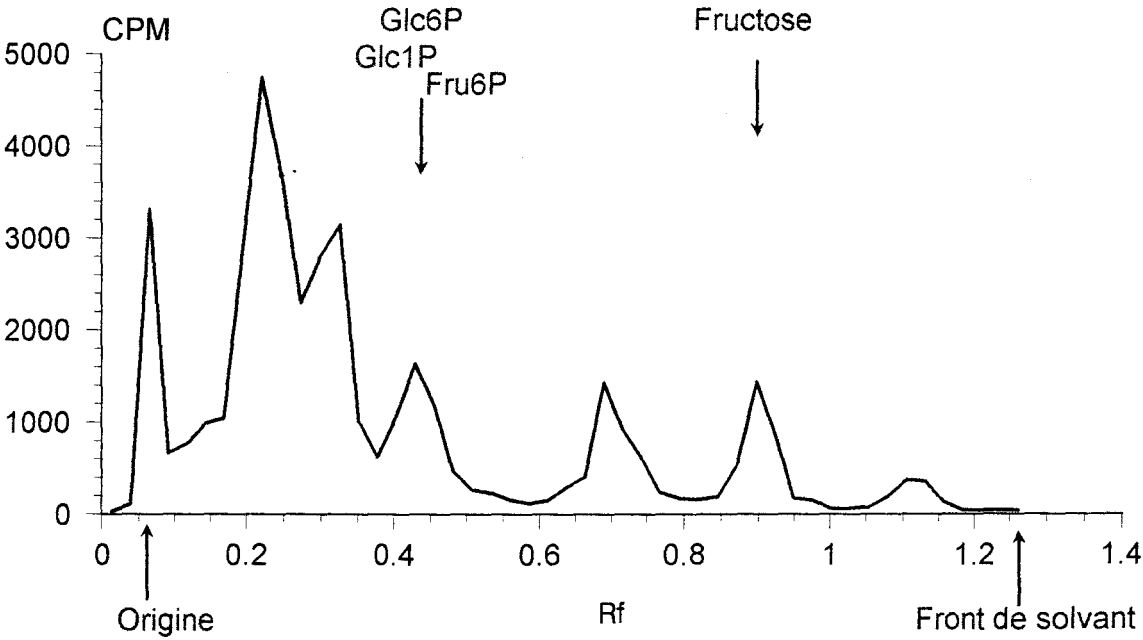


Figure 40 : Chromatogramme des composés radioactifs intracellulaire après une incubation en présence de fructose. Les bifidobactéries sont incubées pendant 3 minutes en présence de fructose radioactif. Les bactéries sont lavées puis cassées aux ultrasons. Les composés intracellulaires sont séparés par chromatographie descendante sur papier. Après séchage de la feuille, des bandes horizontales de 1 cm sont découpées, puis mises à compter.

l'origine ($R_f=0,07$), l'autre migrant comme le fructose ($R_f=0,897$), un autre comme un monosaccharide phosphorylé ($R_f=0,429$, certainement du fructose-6-phosphate) et le dernier comme un saccharide diphosphorylé ($R_f=0,22$). Le fructose, incorporé rapidement chez *Bifidobacterium bifidum*, serait tout aussi rapidement phosphorylé pour donner du fructose-6-phosphate et ensuite, rejoindre le shunt bifide ou permettre la biosynthèse de macromolécules. Les deux derniers pics ($R_f=0,325$, $R_f=0,689$) pourraient être des métabolites issus du "shunt bifide".

La présence de fructose non phosphorylé au niveau intracellulaire confirme son transport par un symport et non par une translocation de groupe.

D-Discussion

A la vue des résultats que nous avons obtenus soit après action des inhibiteurs de translocases, soit après l'étude de la phosphorylation en présence d'ATP, soit enfin après l'étude de l'action de différents cations, nous pouvons penser que le transport du fructose chez *Bifidobacterium bifidum* pourrait s'effectuer par l'intermédiaire d'un symport à proton. La capacité de pénétration du fructose ne varie pas selon le saccharide utilisé pour la culture des bactéries. Ce système de transport est constitutif et spécifique du fructose. La capacité d'incorporation et de phosphorylation est très élevée par rapport à celles des autres saccharides étudiés jusqu'à présent.

De plus, au laboratoire, nous avons démontré que *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082 ne possédait pas de β -fructofuranosidases capables de libérer du fructose à partir des oligofructosides. La présence d'un système de transport aussi efficace que celui-ci reste un peu égnimatique pour une bactérie qui n'aura jamais la possibilité d'être en présence de fructose. Une des hypothèses émises, est le phénomène de symbiose. De très nombreuses bactéries sont présentes au niveau du tractus intestinal, certaines comme *Bifidobacterium adolescentis* et *infantis* possèdent des β -fructofuranosidases libérant le fructose de ses associations (Muramatsu *et al.*, 1993; Imamura *et al.*, 1994), *Bifidobacterium bifidum* possédant une vitesse élevée d'incorporation du fructose, pourrait détourner à son profit le fructose libéré par les enzymes des autres bactéries.

Chez *Xanthomonas campestris*, le fructose est véhiculé par une perméase couplée à une fructokinase ATP-dépendante (de Crécy-Lagard *et al.*, 1991). Chez *Bifidobacterium bifidum*, la phosphorylation du fructose diminue en présence d'ATP ou de

phosphoénolpyruvate. On peut imaginer que la phosphorylation du fructose et son entrée dans le "shunt bifide" serait régulées par la balance des composés intracellulaires riches en énergie. L'ATP formé pourrait moduler l'activité de la fructokinase de deux façons.

On peut imaginer un premier système où la fructokinase serait inhibée par phosphorylation (excès d'ATP dans le milieu) et activée par déphosphorylation.

Le deuxième système pourrait être une régulation de type allostérique, l'excès d'ATP se traduirait par une phosphorylation du fructose-6-phosphate en donnant du fructose-1,6-diphosphate, inhibiteur allostérique de la kinase.

Ces deux mécanismes limiteraient la production de fructose-6-phosphate et augmenteraient le pool intracellulaire de fructose libre. Ce dernier serait alors expulsé vers le milieu extérieur, peut être par l'intermédiaire d'un mécanisme nécessitant la consommation d'énergie, dans ce cas, cela permettrait de réguler le taux d'ATP intracellulaire (Figure 41, page 133).

VII-TRANSPORT DE LA N-ACÉTYLGLUCOSAMINE

A-Induction

L'incorporation de la N-acétylglucosamine varie faiblement selon le saccharide utilisé lors de la culture des bifidobactéries. Lors d'une culture en TPY + glucose, elle est équivalente à $1,57 \pm 0,56$ nmol/min/mg de protéine, en TPY + GlcNAc, elle est de $2,41 \pm 0,27$ nmol/min/mg de protéine. Le système de transport de la N-acétylglucosamine est donc constitutif.

B-Mécanisme d'incorporation

1-Action des inhibiteurs de translocases

Des effecteurs de translocases ont été utilisés afin de définir le mécanisme de transport de la N-acétylglucosamine (Figure 42, page 134). Le DCC et l'*o*-phénanthroline

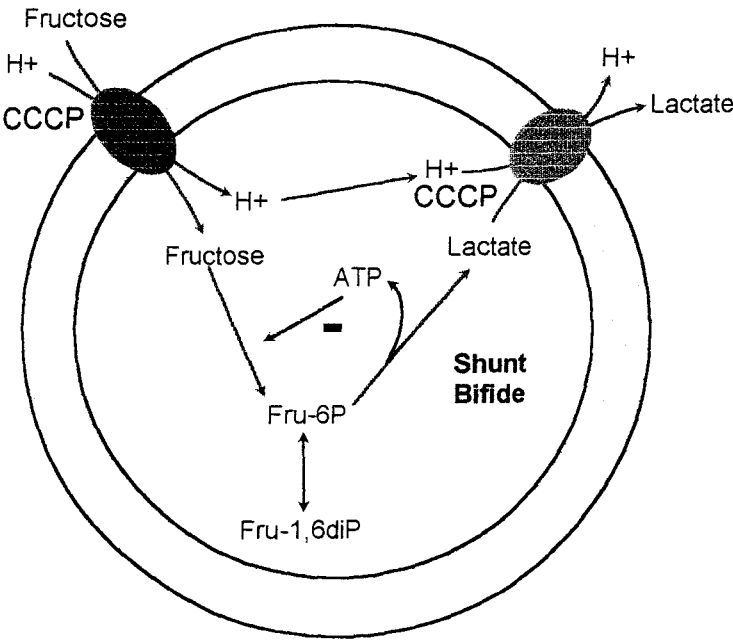


Figure 41 : Représentation schématique du mécanisme de transport du fructose et de sa régulation.

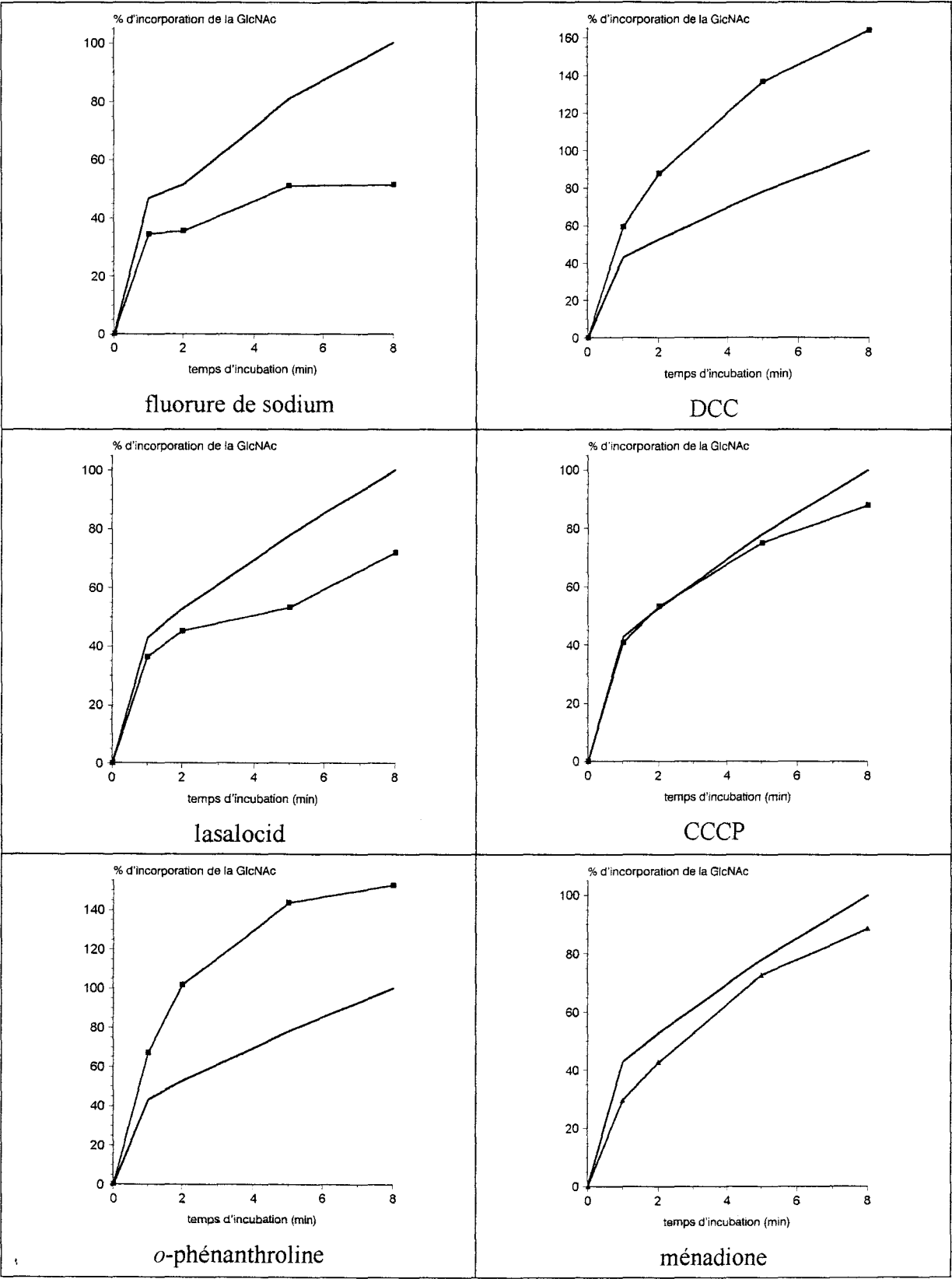


Figure 42 : Influence des inhibiteurs de translocases sur la pénétration de la N-acétylglucosamine. Activité en présence (■) et en absence (—) d'effecteur

activent respectivement par un facteur 1,6 et 1,5 la pénétration de la N-acétylglucosamine. Le CCCP et la ménadione n'ont aucun effet sur cette incorporation. L'inhibition de la pénétration de la N-acétylglucosamine est respectivement de 29 % et de 49 %, quand on utilise la lasalocid et le fluorure de sodium.

Le DCC inhibe la synthèse de l'ATP et diminue le pool d'ATP intracellulaire accessible aux différentes kinases. L'activité de la N-acétylhexosamine kinase serait, elle aussi, régulée par le taux d'ATP comme nous l'avons décrit pour le fructose.

A ce stade des résultats on peut supposer que la N-acétylglucosamine serait véhiculée au travers de la membrane, soit par une translocation de groupe, soit par un symport à cation.

2-Influence du phosphoénolpyruvate et de l'ATP

L'activité N-acétylglucosamine kinase est très faible par rapport à la glucokinase (7 fois inférieure). L'activité de la kinase est multipliée par 5 lors de l'ajout d'ATP au tampon d'incubation et par 2 en présence de phosphoénolpyruvate (Tableau XIX, page 136). Le phosphoénolpyruvate active donc faiblement l'incorporation de la N-acétylglucosamine.

L'activité N-acétylhexosamine kinase est activée par les composés possédant des liaisons riches en énergie et plus précisément par l'ATP.

3-Influence des sels

L'incorporation de la N-acétylglucosamine a été étudiée en présence des principaux cations susceptibles d'être véhiculés par un symport à cation (Tableau XX, page 136). Le lithium n'a pas d'influence sur la pénétration de la N-acétylglucosamine, le sodium n'augmente la capacité d'incorporation de la N-acétylglucosamine que pour des concentrations de l'ordre de 100 mM. Le potassium est quant à lui efficace dès la plus faible concentration (50 mM). L'incorporation de la N-acétylglucosamine semble donc être régulée par les ions potassium, et il semble y avoir un mécanisme de saturation de ce processus pour des concentrations voisines de 50 mM.

Avant d'envisager le transport de la N-acétylglucosamine par l'intermédiaire d'un symport à potassium, il faut se remémorer que le transport du glucose effectué par

Tableau XIX : Phosphorylation de la N-acétylglucosamine en fonction du donneur d'énergie.

	nmol de sucre phosphorylé/min/mg de protéine	
Donneur d'énergie	<i>Bifidobacterium bifidum</i> N-acétylglucosamine	<i>Bifidobacterium bifidum</i> glucose
Témoin	0,562 ± 0,038	3,49 ± 0,09
ATP	2,75 ± 0,096	4,76 ± 0,16
PEP	1,02 ± 0,062	3,14 ± 0,09

Tableau XX : influence des ions sur l'incorporation de la N-acétylglucosamine.

Sels	[Sels] mM	Incorporation (nmol/min/mg de protéine)	Incorporation (%)
Témoin	0	2,39 ± 0,03	100
KCl	50	3,33 ± 0,28	139,3
	100	3,29 ± 0,4	137,6
NaCl	50	2,38 ± 0,05	99,6
	100	3,34 ± 0,2	139,7
LiCl	50	2,29 ± 0,02	100
	100	2,7 ± 0,05	112,9

l'intermédiaire d'une translocase à potassium, est inhibé par la N-acétylglucosamine (50 %). On peut envisager que, dans ce cas précis, l'augmentation d'incorporation de la N-acétylglucosamine en présence des ions potassium ne soit tout simplement due au fait que cette N-acétylhexosamine est capable d'emprunter elle aussi la translocase à glucose.

4-Spécificité de transporteur

Le glucose n'inhibe pas l'incorporation de la N-acétylglucosamine, le transporteur semble nécessiter le groupement N-acétylé sur le carbone 2 pour la reconnaissance du substrat. La N-acétylgalactosamine entraîne une diminution de 15 et 30% de l'incorporation de la N-acétylglucosamine (Tableau XXI, page 138), elle n'a donc que peu d'action sur le transporteur. La position du groupement hydroxyle sur le carbone 4 influence la reconnaissance de la N-acétylglucosamine mais à un degré moindre que le groupement N-acétylé.

L'incorporation de la N-acétylglucosamine s'effectue donc par un système de transport différent du glucose, et qui lui est très spécifique.

L'ensemble des autres saccharides étudiés (lactose, lacto-N-biose et fructose) permet d'augmenter la capacité d'incorporation de ce monosaccharide. Cette observation est remarquable dans le cas du β -D-Gal (1,3) GalNAc qui augmente de 5 à 6 fois cette pénétration. Il y a, semble-t-il une synergie d'incorporation des différents saccharides, voire même une hiérarchisation. Les saccharides neutres serviraient à produire de l'énergie par l'intermédiaire du "shunt bifide" et les N-acétylhexosamines seraient utilisées pour la synthèse de métabolites spécifiques (participation à la biosynthèse du peptidoglycane par exemple).

C-Métabolisme de la N-acétylglucosamine intracellulaire

Le profil de migration (Figure 43, page 139) met en évidence la présence de N-acétylglucosamine intracellulaire ($R_f=1,097$) et une molécule migrant comme un saccharide phosphorylé ($R_f=0,466$). Nous pouvons observer une absence de radioactivité à l'origine, la N-acétylglucosamine n'est donc pas incorporée immédiatement au niveau des macromolécules.

Tableau XXI : Influence des saccharides sur l'incorporation de la N-acétylglucosamine.

Inhibiteurs	[sucre] (mg/ml)	Incorporation (nmol/min/mg de protéine)	Incorporation (%)
Témoin	0	$2,41 \pm 0,27$	100
N-acétylgalactosamine	1	$2,1 \pm 0,26$	86,9
	10	$1,67 \pm 0,25$	69
glucose	1	$2,86 \pm 0,41$	118,3
	10	$3,51 \pm 0,13$	145,6
galactose	1	$2,89 \pm 0,34$	151
	10	$3,16 \pm 0,21$	131
lactose	1	$4,68 \pm 0,33$	194
	10	$5,55 \pm 0,21$	230
fructose	1	$6,39 \pm 0,74$	264,9
	10	$6,91 \pm 0,6$	286,3
Gal β (1,3) GalNAc	1	$11,46 \pm 1,48$	475
	10	$16,04 \pm 0,55$	644,9

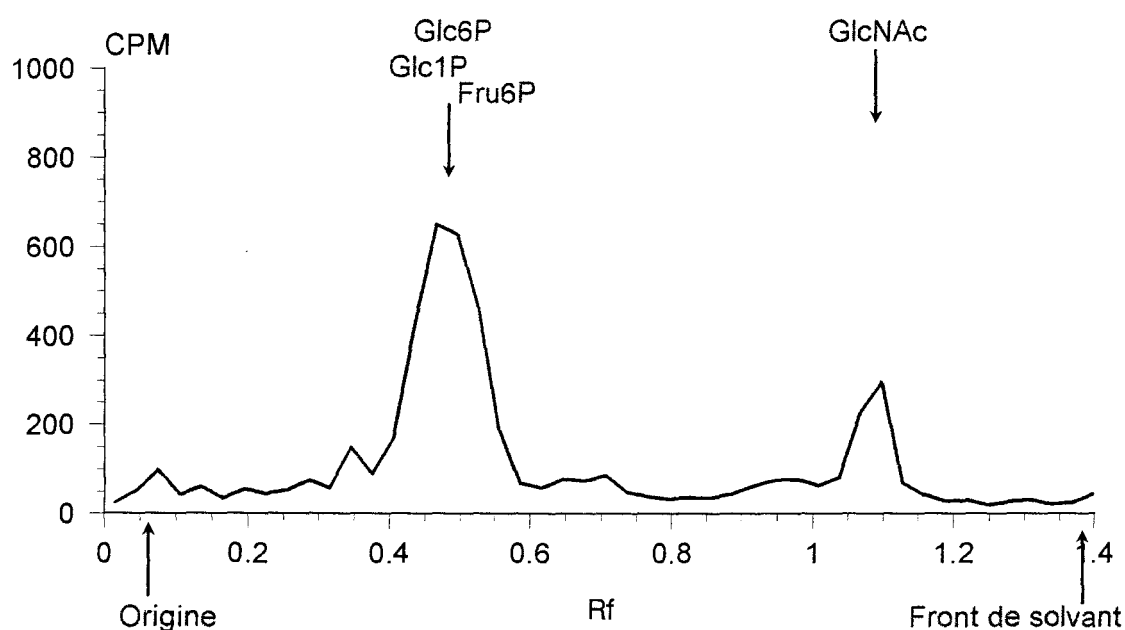


Figure 43 : Profil chromatographique des composés radioactifs intracellulaires après une incubation en présence de N-acétylglucosamine. Les bifidobactéries sont incubées pendant 3 minutes en présence de N-acétylglucosamine radioactive. Les bactéries sont lavées puis cassées aux ultrasons. Les composés intracellulaires sont séparés par chromatographie descendante sur papier. Après séchage de la feuille, des bandes horizontales de 1 cm sont découpées, puis mises à compter.

La présence à faible taux de la N-acétylglucosamine au niveau intracellulaire confirme le passage d'une partie de la N-acétylglucosamine par un système indépendant des phosphotransférases. Le saccharide phosphorylé (vraisemblablement de la N-acétylglucosamine-6-phosphate) peut provenir soit d'un système de transport couplé à une kinase soit à une translocation de groupe permettant la pénétration et la phosphorylation de la N-acétylglucosamine en même temps.

D-Discussion

A la vue des différents résultats, nous pouvons affirmer que la N-acétylglucosamine est véhiculée chez *Bifidobacterium bifidum* par un système de transport qui est spécifique de son substrat. Quant à la définition de la translocase, il est nécessaire d'envisager deux hypothèses : la N-acétylglucosamine peut pénétrer dans la bactérie par (Figure 44, page 141) :

-une translocation de groupe

Cette hypothèse est vérifiée par le fait que l'incorporation de la N-acétylglucosamine est inhibée par le fluorure de sodium à un niveau voisin de 50 %. En outre, un monosaccharide phosphorylé est caractérisé au niveau intracellulaire. Enfin le phosphoénolpyruvate active faiblement la phosphorylation de la N-acétylglucosamine (d'un facteur 2), si on compare cette activité à celle obtenue chez *Escherichia coli* (facteur 8).

-un symport à cation.

Cette hypothèse se vérifie par le fait que le potassium est un élément activateur du transport de la N-acétylglucosamine et que cette dernière se retrouve dans le milieu intracellulaire sans subir de phosphorylation (à moins d'admettre l'existence d'une phosphatase intracellulaire très active). Le transport est par ailleurs inhibé faiblement par la lasalocid (29 %) et la phosphorylation de la N-acétylglucosamine est augmentée en présence d'ATP.

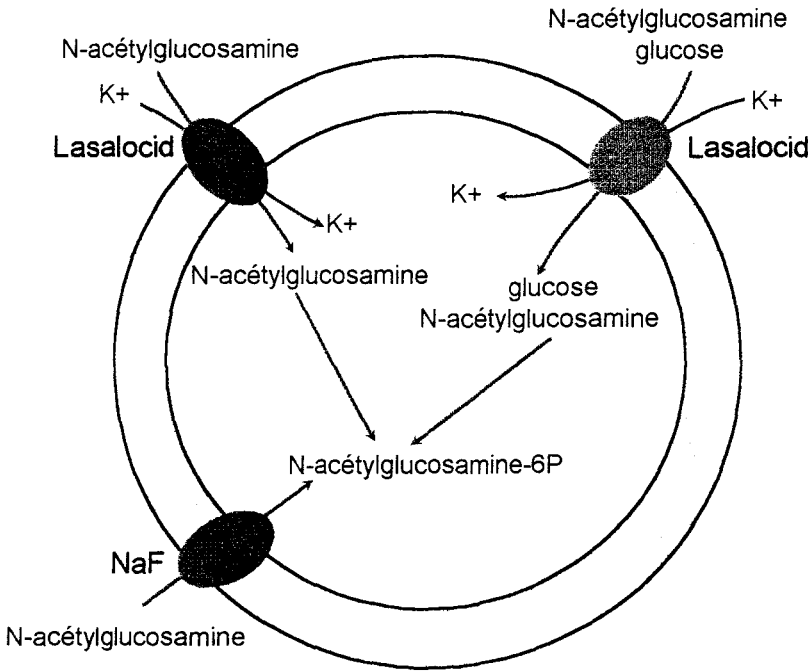


Figure 44 : Représentation schématique des mécanismes possibles de transport de la N-acétylglucosamine.

Nous avons démontré que la N-acétylglucosamine pouvait être véhiculée par le symport du glucose (cf III-4, page 105) et par un système spécifique de la N-acétylglucosamine.

VIII-TRANSPORT DU LACTO-N-BIOSE

A-Mécanisme d'incorporation

Le disaccharide est incorporé à une vitesse de $11,26 \pm 0,49$ nmol/min/mg de protéine. Cette capacité est nettement supérieure à celle du glucose (3,75 nmol/min/mg de protéine), de la N-acétylglucosamine (2,41 nmol/min/mg de protéine), du galactose (2,86 nmol/min/mg de protéine) et du lactose (3,13 nmol/min/mg de protéine). Le lacto-N-biose pénètre sous la forme d'un disaccharide, et, il est hydrolysé par la β -1,3 galactosyl-N-acétylhexosamine phosphorylase pour libérer du Gal-1-phosphate et de la N-acétylglucosamine.

1-Action des inhibiteurs de translocases

Le transport du disaccharide β -D-Gal (1,3) GlcNAc a été étudié en présence d'inhibiteurs de translocases (Figure 45, page 143). La ménadione et l'*o*-phénanthroline n'ont aucune influence sur le transport du lacto-N-biose. Le CCCP (59%), le DCC (50%) et la lasalocid (45%) diminuent l'incorporation du β -D-Gal (1,3) GlcNAc, mais la plus forte inhibition est obtenue avec le fluorure de sodium (74%).

La présence d'une inhibition par le CCCP entraîne une incompatibilité avec la présence d'un système de la phosphotransférase. Le fluorure de sodium doit donc agir au niveau des réactions de phosphorylation. Le DCC baisse le taux d'ATP intracellulaire et diminuerait aussi les activités kinasiques permettant l'utilisation du galactose et de la N-acétylglucosamine. L'inhibition par le CCCP et la lasalocid, nous permet d'envisager le transport du lacto-N-biose soit par un symport à proton soit par un symport à cation. La lasalocid étant capable de diminuer la capacité d'incorporation des symports à proton

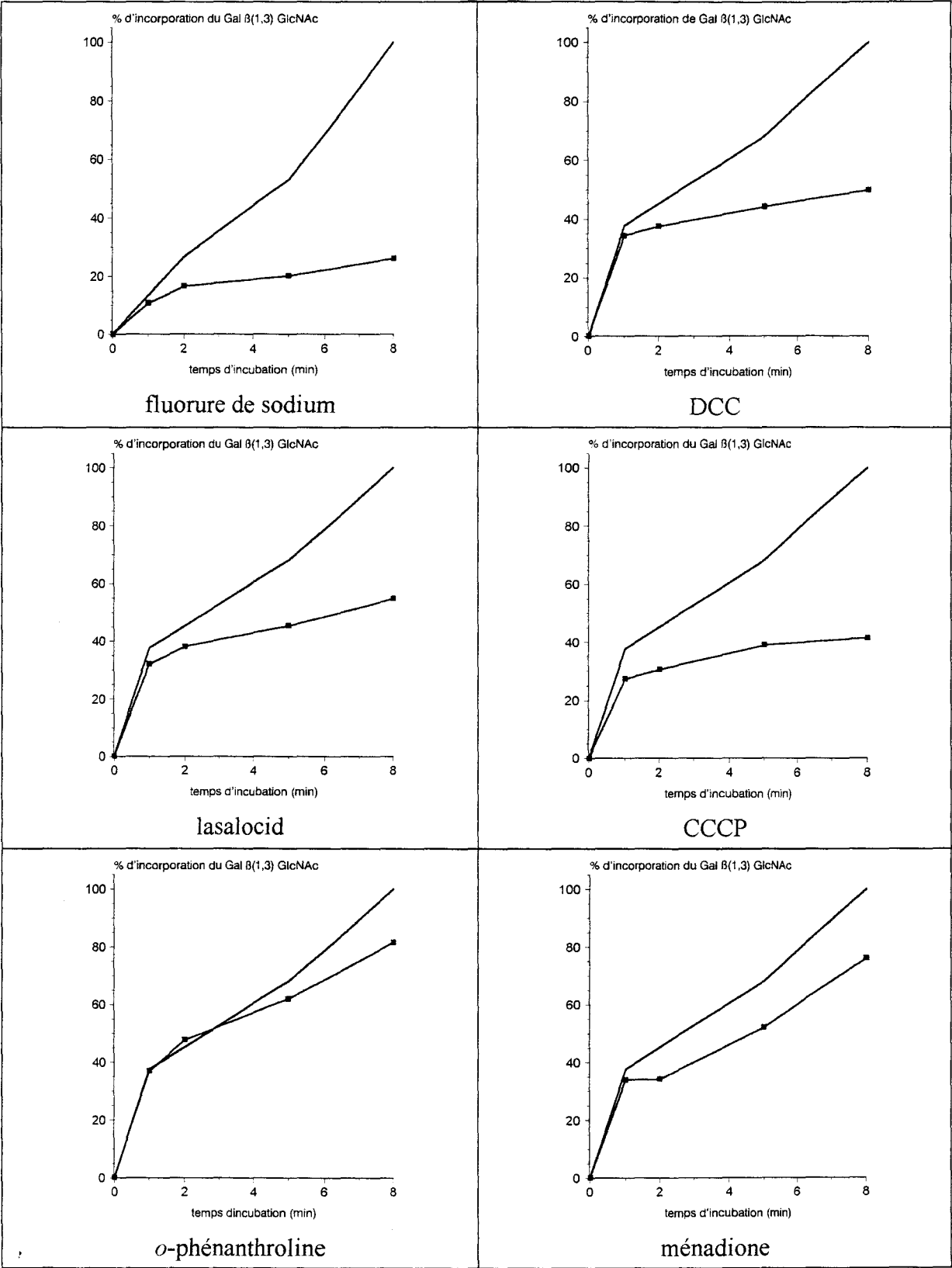


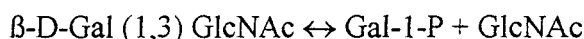
Figure 45 : Influence d'inhibiteurs de translocases sur l'incorporation du lacto-N-biose. Activité en présence (■) et en absence (—) d'effecteur

(Chow et Russel, 1990), nous envisageons que le transport du lacto-N-biose se fasse par un mécanisme de symport à proton.

2-Influence de l'ATP et du phosphoénolpyruvate

La phosphorylation du lacto-N-biose se traduit par la phosphorylation de la N-acétylglucosamine par la N-acétylglucosamine kinase et du galactose par la β -1,3 galactosyl-N-acétylhexosamine phosphorylase lors de la phosphorolyse. Le taux de phosphorylation est multiplié par 8 lors de l'ajout d'ATP et par 2 pour le phosphoénolpyruvate (Tableau XXII, page 145). Cette augmentation de la phosphorylation résulte d'une activation de la N-acétylhexosamine kinase et non pas de l'association des deux systèmes enzymatiques car au laboratoire, nous avons démontré que l'ATP n'augmente pas le taux de galactose-1-phosphate provenant du lacto-N-biose (Dron *et al.*, soumis à publication).

L'hydrolyse du lacto-N-biose est réversible, et soumis à un équilibre :



La présence de N-acétylglucosamine libre dans le milieu intracellulaire entraîne une modulation de l'activité de la β -1,3 galactosyl-N-acétylhexosamine phosphorylase. Lors de l'ajout d'ATP, l'activité de la N-acétylhexosamine kinase est augmentée (cf VII-B-2, page 135), diminuant ainsi le taux de N-acétylglucosamine libre et déplaçant l'équilibre de la réaction de la β -1,3 galactosyl-N-acétylhexosamine phosphorylase dans le sens de la fabrication du galactose-1-phosphate.

3-Spécificité de transporteur

Le fructose n'active pas l'incorporation du lacto-N-biose. Le glucose et la N-acétylglucosamine augmentent la capacité de pénétration du β -D-Gal (1,3) GlcNAc. Le lactose n'inhibe pas la pénétration du lacto-N-biose, la présence d'une N-acétylhexosamine et la liaison en β (1,3) est donc indispensable pour la reconnaissance du substrat par le symport. Le β -D-Gal (1,3) GalNAc inhibe le transport du lacto-N-biose de 40% lorsqu'il est à même concentration et de 80% quand sa concentration est 10 fois supérieure (Tableau XXIII, page 145). Les deux disaccharides issus de la dégradation des mucines

Tableau XXII : Phosphorylation du lacto-N-biose en fonction du donneur d'énergie.

Donneur d'énergie	nmol de sucre phosphorylé/min/mg de protéine	
	<i>Bifidobacterium bifidum</i> β-D-Gal (1,3) GlcNAc	<i>Bifidobacterium bifidum</i> glucose
Témoin	2,29 ± 0,02	3,49 ± 0,09
ATP	15,88 ± 0,87	4,76 ± 0,16
PEP	5,04 ± 0,12	3,14 ± 0,09

Tableau XXIII : Influence des saccharides sur l'incorporation du β-D-Gal (1,3) GlcNAc.

Inhibiteurs	[sucre] (mg/ml)	Incorporation (nmol/min/mg de protéine)	Incorporation (%)
Témoin	0	11,2 ± 0,39	100
Gal β (1,3) GalNAc	1	4,04 ± 0,01	36,1
	10	2,1 ± 0,22	18,7
N-acétylgalactosamine	1	10,1 ± 0,42	90,2
	10	10,67 ± 0,48	95,3
fructose	1	12,22 ± 0,87	109,1
	10	11,1 ± 0,15	99,1
lactose	1	16,15 ± 0,11	144,2
	10	17,97 ± 0,64	160,4
glucose	1	20,59 ± 0,9	183,8
	10	12,54 ± 0,91	119,3
N-acétylglucosamine	1	20,25 ± 0,96	180,8
	10	19,14 ± 0,87	170,9

doivent être véhiculés par la même translocase. La N-acétylhexosamine liée sur le galactose n'influence donc pas l'incorporation du disaccharide.

B-Dégradation du lacto-N-biose intracellulaire

Nous observons cinq pics majeurs en chromatographie descendante sur papier (Figure 46, page 147). Deux molécules sont identifiables aisément, l'une est de la N-acétylglucosamine ($R_f=1,097$), l'autre est du Gal-1-phosphate ($R_f=0,339$). Les autres molécules migrent comme des monosaccharides phosphorylés ($R_f=0,42$), ou comme un disaccharide ($R_f=0,637$), ou encore reste à l'origine ($R_f=0,07$).

La présence d'un pic migrant comme un disaccharide laisse supposer que la pénétration du lacto-N-biose s'effectue par un système indépendant de la phosphotransférase. Le galactose-1-phosphate est converti rapidement en glucose-1-phosphate et la N-acétylglucosamine en fructose-6-phosphate. Le glucose phosphorylé ainsi formé peut être incorporé dans les polysaccharides bactériens.

C-Discussion

Le β -D-Gal (1,3) GlcNAc et le β -D-Gal (1,3) GalNAc sont véhiculés par un symport à proton qui leur est spécifique. Le transport des disaccharides est couplé à l'activité de la β -1,3 galactosyl-N-acétylhexosamine phosphorylase intracellulaire qui permet de générer du galactose-1-phosphate et la N-acétylglucosamine. Le galactose-1-phosphate serait rapidement converti en glucose-1-phosphate et la N-acétylglucosamine en N-acétylglucosamine-6-phosphate. Ils rejoindraient ainsi le shunt bifide via le glucose-6-phosphate ou le fructose-6-phosphate.

La présence de la β -1,3 galactosyl-N-acétylhexosamine phosphorylase permet une incorporation plus rapide du galactose. En effet, dans le cas d'une hydrolyse par une β (1,3) galactosidase extracellulaire, le galactose ainsi produit ne pénétrerait que très lentement dans les bifidobactéries. Si cette β (1,3) galactosidase est intracellulaire, les disaccharides pénètrent dans la bactérie, et sont ensuite hydrolysés. Le galactose intracellulaire est phosphorylé par sa galactokinase pour rejoindre le shunt bifide. Chez *Bifidobacterium*

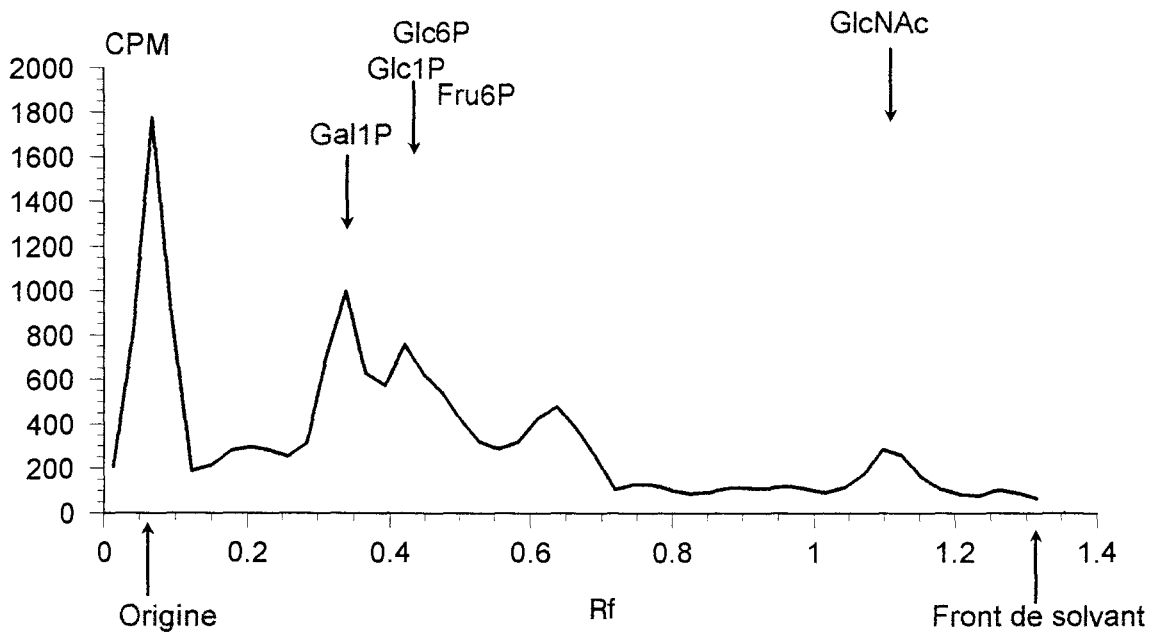


Figure 46 : Profil chromatographique des composés radioactifs intracellulaires après une incubation en présence de lacto-N-biose. Les bifidobactéries sont incubées pendant 3 minutes en présence de β -D-Gal (1,3) GlcNAc radioactif. Les bactéries sont lavées puis cassées aux ultrasons. Les composés intracellulaires sont séparés par chromatographie descendante sur papier. Après séchage de la feuille, des bandes horizontales de 1 cm sont découpées, puis mises à compter.

bifidum DSM 20082, l'activité galactokinase est très faible, et par ce fait le galactose ne serait que très lentement incorporé par la bactérie.

IX-RÉGULATION DU TRANSPORT DES SACCHARIDES

A-Influence des saccharides entre eux

Au cours des études concernant les différentes translocases des saccharides, nous avons mis en évidence, des inhibitions d'incorporation mais aussi des activations. L'ensemble de ces interactions est résumé par le Tableau XXIV, page 149.

Le glucose est capable d'activer l'incorporation de la N-acétylglucosamine et du lacto-N-biose, par contre, il inhibe la pénétration du fructose.

Le galactose, β -D-Gal (1,3) GalNAc et le lactose permettent d'augmenter le taux intracellulaire de la N-acétylglucosamine.

Le fructose n'inhibe aucun des systèmes de transport étudiés, mais active de manière considérable l'incorporation du glucose, de la N-acétylglucosamine et du lactose.

La N-acétylglucosamine active le transport des disaccharides (Lacto-N-biose et lactose) et diminue l'incorporation du glucose.

Le β -D-Gal (1,3) GalNAc augmente la capacité de pénétration du glucose.

B-Discussion

Les mécanismes d'incorporation des saccharides chez *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082 sont indépendants de l'incorporation du glucose contrairement à ce qui se passe chez d'autres bactéries. Chez *Escherichia coli*, cette régulation met en oeuvre l'action de la protéine Π_A^{Glc} au niveau de l'AMP cyclique et chez les bactéries à Gram positif, la régulation du transport des saccharides est due à un système de phosphodéphosphorylation de la protéine HPr. Cette non régulation des systèmes de transport par le glucose peut s'expliquer par l'absence d'un système de la phosphotransférase du glucose. L'inhibition du glucose est certainement due à son homologie avec le fructose. Degnan et Macfarlane (1991) ont décrit une consommation préférentielle du glucose chez

Tableau XXIV : Inhibition des systèmes de transport par d'autres saccharides.

effecteur (10 mg/ml)	% du saccharide incorporé				
	glucose	fructose	N-acétylglucosamine	Lacto-N-biose	lactose
Glc	ND	45,9	145,6	119,3	98,8
Fru	480	ND	286,3	99,1	578,9
GlcNAc	45,7	89,9	ND	170,9	238,5
GalNAc	162	89,1	69	95,3	164,8
Gal	66,2	ND	131	ND	81,3
Lactose	109,6	96,6	230	160,4	ND
β -D-Gal (1,3) GalNAc	168,9	ND	644,9	18,7	88,3

ND : non déterminé.

Bifidobacterium bifidum NCFB 2203, cette étude a été effectuée sur des temps de culture allant jusqu'à 35 heures. De plus, il n'y a pas une inhibition totale de la consommation des autres saccharides (galactose, mannose, arabinose et xylose). A la vue de ces résultats, nous pouvons affirmer que le glucose n'est pas le saccharide modulateur des systèmes de transport chez *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082.

Les différentes inhibitions que nous avons observées pour chaque système de transport, sont essentiellement dues aux analogies de structures entre le saccharide véhiculé et le saccharide inhibiteur, comme la N-acétylglucosamine et le galactose sur le glucose, le glucose sur le fructose ou encore le β -D-Gal (1,3) GalNAc sur le lacto-N-biose.

Par contre, certains saccharides permettent d'activer la pénétration des autres saccharides, il y a donc un phénomène de synergie entre les différents saccharides. Cette activation n'affecterait pas le système de transport lui-même, mais permettrait soit d'augmenter le pool d'ATP intracellulaire, soit de diminuer la quantité de saccharide intracellulaire. Les saccharides sont rapidement phosphorylés à l'intérieur de la bactérie et sous cette forme, ils ne peuvent plus retraverser la membrane. Pour augmenter l'incorporation d'un saccharide, il suffit donc d'activer sa phosphorylation par les kinases. A l'inverse, la présence d'un saccharide régulant l'incorporation des autres systèmes de transport pourrait inhiber les kinases et activer des phosphatases spécifiques des autres saccharides augmentant ainsi leur taux à l'état libre intracellulaire. La bactérie pour réguler ce taux pourrait induire une expulsion des saccharides non phosphorylés.

Le cas du fructose en est l'exemple type, il permet d'augmenter l'incorporation de tous les saccharides testés. Nous pouvons supposer que le fructose incorporé entraîne une augmentation rapide du pool d'ATP intracellulaire et permet donc d'augmenter l'activité des différentes kinases nécessaires à la dégradation des saccharides. L'autre hypothèse est que le fructose aurait une voie métabolique différente des autres saccharides et l'un de ces métabolites (fructose-1,6-diphosphate) activerait la dégradation des saccharides intracellulaires. Cette hypothèse se vérifie en partie car De Vries et son équipe (1967) ont caractérisé une faible activité phosphofructokinase (EC 2.7.1.11) qui permet la formation de fructose-1,6-diphosphate capable d'augmenter l'activité de la lactate déshydrogénase.

Conclusions

Le but de nos travaux était de mieux connaître les capacités d'incorporation des saccharides chez *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082. Pour ce faire nous avons entrepris deux séries d'études, l'une concernant la capacité des bifidobactéries à utiliser les saccharides, l'autre s'intéressant plus particulièrement aux mécanismes de transport membranaire de ces composés.

Les résultats que nous avons obtenus lors de cette première série d'étude nous montrent que les bifidobactéries sont capables de proliférer en milieu nutritif riche (TPY) en absence ou en présence de saccharides (fructose, galactose, glucose, N-acétylglucosamine, N-acétylgalactosamine et lactose). Cette croissance, en absence de glucides, confirme la capacité des bifidobactéries à croître en présence d'hydrolysats enzymatiques de caséine bovine (facteur "bifidogène" BF2).

En milieu semi-synthétique (milieu de Garches modifié), il n'y a pas de croissance bactérienne ce qui prouve que l'hydrolyse acide de la caséine ne permet pas à *Bifidobacterium bifidum* de se développer à moins que l'on ajoute au milieu des N-acétylhexosamines. Dans ce cas précis, on peut considérer que ces saccharides sont les seules sources de carbone assimilables par le microorganisme. Ces observations se rapprochent de celles effectuées par Rose *et al.* (1954) concernant les propriétés "bifidogènes" des oligosaccharides du lait de femme. Selon ces auteurs, les oligosaccharides du gynolactose sont des facteurs de croissance des bifidobactéries. Ces auteurs avancent que ce sont les N-acétylglucosamines qui possèdent ces propriétés. Dans notre cas, en connaissant le potentiel enzymatique de *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082, nous pouvons affirmer que cette bactérie possède toutes les activités indispensables à la dégradation des oligosaccharides du lait de femme afin d'en obtenir la N-acétylglucosamine libre.

Dans le tractus digestif, *Bifidobacterium bifidum* pourra obtenir ce monosaccharide ou la N-acétylgalactosamine à partir de la dégradation des mucines intestinales. Ce qu'on a défini comme un facteur de croissance (facteur "bifidogène" BF1) ne serait en fait, qu'une source de carbone et d'azote préférentiellement assimilable par *Bifidobacterium bifidum*.

Quand on examine la structure des N-acétylhexosamines, on remarque l'existence d'une liaison amide ($\text{CH}_3\text{-CO-NH-}$). Ceci est à rapprocher du fait que l'hydrolyse enzymatique de la caséine préserve la prolifération de *Bifidobacterium bifidum* alors que l'hydrolyse chimique, avec transformation de la glutamine et de l'asparagine en acides correspondants, ne permet pas la croissance de *Bifidobacterium bifidum*. On peut donc

imaginer que la bactérie a besoin de carbone, qui peut être apporté par les saccharides mais qu'elle a surtout besoin d'azote organique apporté par les fonctions amides.

Les résultats préliminaires concernant l'assimilation des saccharides ont été obtenus en utilisant la technique de microcalorimétrie. Cette dernière nous permet de connaître la consommation en saccharide par la quantification de la quantité de chaleur dégagée. La quantité de chaleur mesurée est fonction de la quantité de saccharide consommé (plus la quantité de saccharide consommée est élevée, plus la quantité de chaleur dégagée est importante).

On notera au passage, le comportement particulier du fructose qui dégage des quantités de chaleur bien supérieures à celles obtenues par des saccharides ayant un même taux d'incorporation. Le fructose, présente en outre, la particularité de faciliter le transport membranaire d'un certain nombre de saccharides. Cette synergie que nous avons remarquée doit être en relation avec le métabolisme particulier des glucides chez *Bifidobacterium bifidum*.

Les résultats obtenus lors de notre étude concernant le transport membranaire des glucides nous ont permis de caractériser six mécanismes différents que nous résumerons ci-après (Figure 47, page XXX).

1-Le mécanisme de transport du glucose est constitutif. Ce dernier n'est pas véhiculé par l'intermédiaire d'un système de la phosphotransférase comme cela a été décrit par Degnan et Macfarlane (1993) chez *Bifidobacterium breve*. Nous avons mis en évidence que le glucose pénètre dans la bactérie par un système de symport à cation. L'ion qui participe au cotransport a été défini comme étant le potassium. Quand on étudie le transport des autres saccharides en présence du glucose, on ne remarque pas de phénomène de répression comme c'est le cas chez de nombreuses bactéries. Le glucose ne semble pas être le saccharide privilégié dans le métabolisme glucidique de *Bifidobacterium bifidum*.

2-Le transport du galactose est le plus lent que nous ayons pu caractériser lors de cette étude. Le fait qu'il ne nous a pas été possible d'inhiber sa pénétration par l'intermédiaire d'inhibiteurs spécifiques de translocases, associé à l'impossibilité d'obtenir le phénomène de saturation même pour des concentrations élevées en galactose, nous amène à penser que le transport du galactose dépendrait d'un mécanisme de diffusion. Le mécanisme de diffusion simple n'a cependant été décrit chez les bactéries que pour le

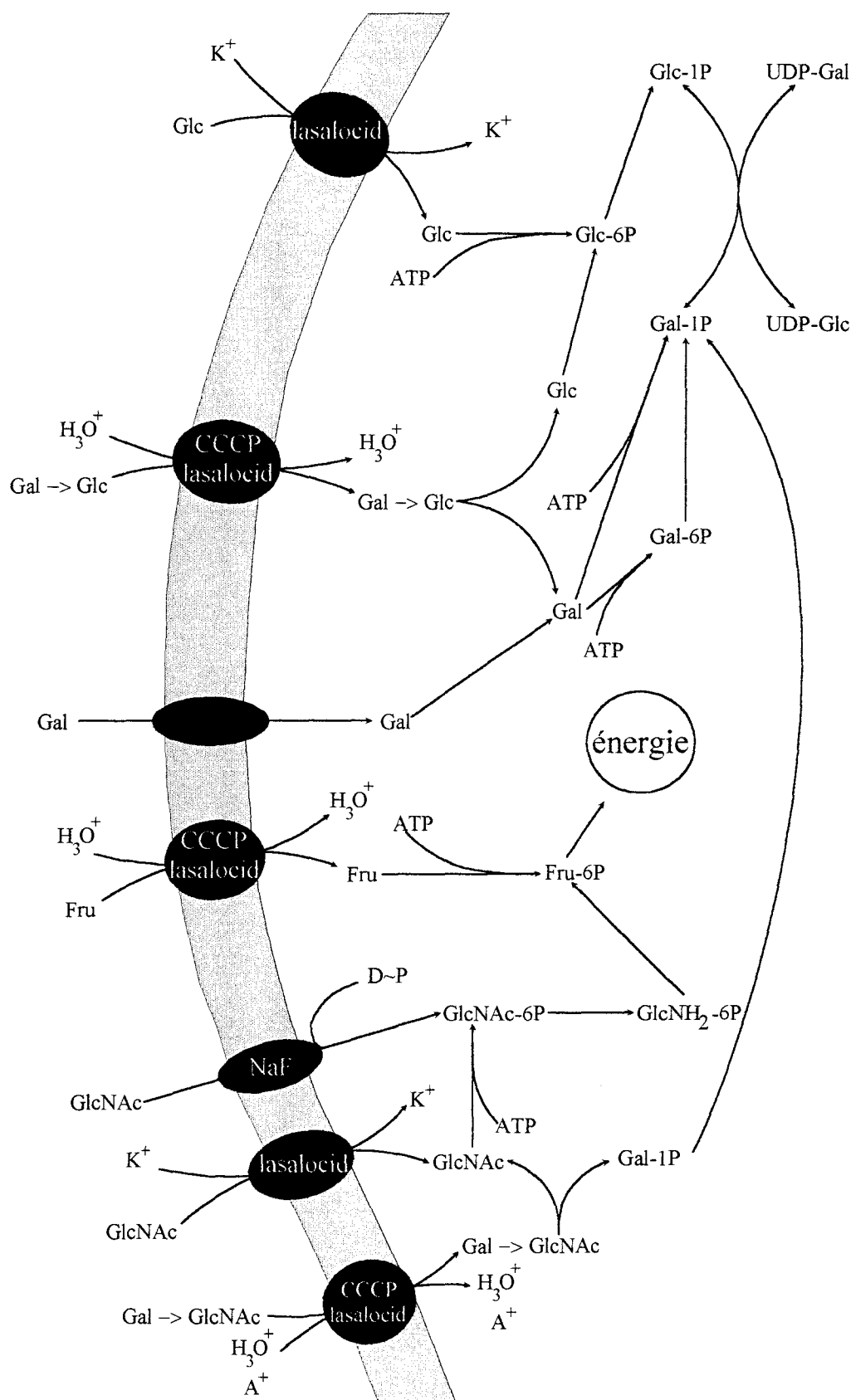


Figure 47 : Bilan des différents mécanismes d'incorporation des saccharides.

glycérol et les ions. On peut supposer que la faible incorporation du galactose se fasse par un mécanisme de diffusion facilitée et par la translocase du lactose. Le galactose, une fois traversé la membrane, est très lentement phosphorylé par la galactokinase. Il y a peu de transformations de cette molécule par la suite.

3-L'étude du transport du lactose montre que ce disaccharide est incorporé par un mécanisme identique à celui décrit chez *Escherichia coli* (symport à proton). Mais il n'est pas induit par des concentrations élevées en lactose dans le milieu de culture, ni par la présence d'analogues de structure non métabolisable (IPTG). Il pénètre à l'intérieur de la bactérie sous la forme de disaccharide pour être hydrolysé en galactose et glucose par une lactase intracellulaire. Ces différents saccharides sont, par la suite, phosphorylés par leurs kinases respectives. Dans le cas, du transport du lactose, il peut exister une ambiguïté. La bactérie possède des activités β -D-galactosidasiques et lactasiques intégrées au niveau des enveloppes de la bactérie et plus particulièrement en position extracellulaire. On peut très facilement imaginer dans ces conditions une hydrolyse extracellulaire du lactose et l'incorporation des monosaccharides obtenus. Comme nous l'avons vu précédemment, l'incorporation du galactose s'effectuerait très lentement, accompagné d'une phosphorylation lente. Ce qui est peu compatible avec le métabolisme que nous avons caractérisé.

4-L'incorporation du fructose est constante quelque soit le saccharide ajouté dans le milieu de culture. Par contre, il augmente le transport membranaire de nombreux saccharides. Cet effet synergique n'est pas, pour le moment, expliqué. On peut imaginer que le fructose sera le saccharide de prédilection de *Bifidobacterium bifidum*, en remplacement du glucose. Ce sera le fructose qui donnera le plus facilement de l'énergie par l'intermédiaire du "shunt bifide". A ce sujet, on remarque que la vitesse de phosphorylation du fructose est très supérieure à celles des autres saccharides utilisés au cours de cette étude. La fructokinase est inhibée par des teneurs élevées en ATP. Cette observation nous amène à penser que ce système enzymatique pourrait être régulé, soit par un mécanisme de phosphorylation-déphosphorylation, soit par un effecteur allostérique comme le fructose-1,6-di phosphate. Le fructose est transporté au travers de la membrane par un symport à proton.

5-Nous n'avons pas réussi à définir avec précision quelle était la translocase de la N-acétylglucosamine. Ce monosaccharide pourrait être transporté par deux mécanismes différents.

a-une pénétration par l'intermédiaire d'une translocation de groupe. Cette hypothèse est confortée par le fait que nous avons mis en évidence une inhibition du transport par le fluorure de sodium, la présence de monosaccharide intracellulaire phosphorylé et une légère activation par le phosphoénolpyruvate.

b-une pénétration par un symport à cation, il faut aussi envisager cette possibilité car nous avons caractérisé de la N-acétylglucosamine intracellulaire libre, une activation de la phosphorylation par l'ATP et une inhibition par la lasalocid.

La N-acétylglucosamine peut aussi emprunter la translocase du glucose sans que ce dernier puisse utiliser le transporteur de la N-acétylglucosamine.

6-Les disaccharides obtenus par hydrolyse des mucines, β -D-Gal (1,3) GlcNAc et β -D-Gal (1,3) GalNAc sont transportés par un symport à proton. Ce transport des disaccharides est couplé à la β -1,3 galactosyl-N-acétylhexosamine phosphorylase intracellulaire qui permet de générer du galactose-1-phosphate et de la N-acétylhexosamine. La production du galactose phosphorylé est dans ce cas précis beaucoup plus rapide que la phosphorylation du monosaccharide par la galactokinase. Lors de la dégradation *in vivo* des mucines, il y aurait libération préférentielle de ces disaccharides et incorporation rapide de ceux-ci. Nous rejoignons en cela, les conclusions de Hoskins *et al.* (1992), qui envisageaient que ces disaccharides non utilisés par les autres bactéries intestinales (*Bacteroides* en particulier) devaient être des facteurs "bifidogènes" pour *Bifidobacterium bifidum* trouvée dans les fèces d'enfants allaités au sein. Ces oligosaccharides doivent permettre, en même temps, le maintien de la flore bifide. Nos conclusions sont quelque peu différentes. D'une part nous estimons que l'espèce *Bifidobacterium bifidum* va dégrader les mucines par l'utilisation des exoglycosidases mais en limitant l'action des β -D-galactosidases vis-à-vis de ces structures, de telle sorte que la concentration en galactose libre au niveau de la lumière intestinale soit toujours faible. D'autre part, la souche *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082 ne peut proliférer qu'en présence de N-acétylglucosamine. L'incorporation du disaccharide permet donc, à la fois, de métaboliser rapidement le galactose sous forme de galactose-1-phosphate et de récupérer la N-acétylglucosamine nécessaire à ses réactions de biosynthèse.

L'ensemble des résultats que nous avons obtenus, bien que préliminaires, nous permet de mieux appréhender les mécanismes d'incorporation et d'assimilation des saccharides par *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082. Cependant, il reste encore beaucoup de questions auxquelles il faut répondre. Plusieurs axes de recherche sont à envisager pour la suite de ce travail.

1-L'assimilation des saccharides, par la technique de microcalorimétrie, devra être poursuivie. Il sera, en effet, intéressant de visualiser le comportement des autres espèces de bifidobactéries vis-à-vis des différents saccharides et plus particulièrement vis-à-vis des N-acétylhexosamines. Nous espérons de cette manière, obtenir des renseignements expliquant la succession des différentes espèces de bifidobactéries au niveau intestinal, en fonction de l'âge des individus.

La technique de microcalorimétrie pourra, aussi, être utilisée pour étudier l'action de composés à structures complexes sur la prolifération des bifidobactéries. Les composés qui seront plus particulièrement ciblés, sont les mucines intestinales et les oligosaccharides utilisés comme prébiotiques (FOS, TOS, GOS).

Enfin d'un point de vue taxonomique, il sera peut être possible, en étudiant les quantités de chaleur dégagée lors de la fermentation des saccharides, de classer les différentes espèces du genre. Cette technique pourrait venir en complément d'une classification phénotypique.

2-La mise en évidence de synergie dans le transport des saccharides par le fructose nous amène à étudier ce mécanisme. Pourquoi le fructose va-t-il faciliter l'incorporation? Son action résulte-t-elle uniquement d'une production élevée en groupement énergétique (ATP)? Ou est-elle le résultat d'une régulation plus fine par l'intermédiaire de dérivés phosphorylés de ce dernier? L'étude de l'action du fructose-1,6-diphosphate et du 2,6-diphosphate vis-à-vis des mécanismes de régulation du métabolisme glucidique devra être abordée. A ce niveau, il faudra aussi vérifier si ce phénomène est valable pour toutes les espèces de bifidobactéries ou seulement pour l'espèce *Bifidobacterium bifidum* ou encore uniquement pour la souche étudiée.

3-En ce qui concerne les mécanismes de transport des saccharides, le premier objectif sera de définir exactement par quel système les N-acétylhexosamines libres vont

pénétrer à l'intérieur de la bactérie. Cette étude devra s'envisager sans que la modification intracellulaire des saccharides ne vienne interférer. Dans ces conditions, il sera indispensable de travailler sur des systèmes vésiculaires, cela nous amènera à définir des conditions expérimentales pour la production de protoplastes chez *Bifidobacterium bifidum*.

Dans le cadre du transport des disaccharides renfermant une N-acétylhexosamine nous espérons pouvoir engager une étude concernant la caractérisation physico-chimique du transporteur et son implantation au niveau membranaire. Comme il est peu probable d'obtenir des quantités importantes de cette molécule par les techniques biochimiques conventionnelles, il nous faudra envisager l'utilisation des techniques de biologie moléculaire.

Bibliographie

Akao T., Che Q-M., Kobashi K., Yang L., Hattori M. and Namba T. 1994.

Isolation of a human intestinal anaerobe, *Bifidobacterium* sp. strain SEN, capable of hydrolyzing sennosides to sennidins. (32)

Appl. Environ. Microbiol., **60**:1041-1043.

Ballongue J. 1993.

Bifidobacteria and probiotic action.

In "Lactic acid bacteria", pp. 357-428, Salminen, S. and von Wright, A. (Eds.), New York. (33, 47)

Ballongue J., Grill J-P. et Baratte-Euloge P. 1993.

Action sur la flore intestinale de laits fermentés au *Bifidobacterium*.

Lait, **73**:249-256. (47)

Barnes E.M. jr. 1972.

Respiration-coupled glucose transport in membrane vesicles from *Azotobacter vinelandii*.

Arch. Biochem. Biophys., **152**:795-799. (58)

Beckwith J. 1987.

The lactose operon.

In "*Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* cellular and molecular biology", pp 1444-1451, Neidhart, F.C. (Ed.), Washington DC American Society of Microbiology. (57/110)

Beerens H. et Tahon-Castel M. 1965.

Infections humaines à bactéries anaérobies non toxigènes, Presses Académiques Européennes, Bruxelles. (43)

Beerens H. 1990.

An elective and selective isolation medium for *Bifidobacterium* spp.

Lett. Appl. Microbiol., **11**:155-157. (21)

Belaich A. and Belaich J-P. 1976a.

Microcalorimetry study of the anaerobic growth of *Escherichia coli*: growth thermograms in a synthetic medium.

J. Bacteriol., **125**:14-18. (78)

Belaich A. and Belaich J-P. 1976b.

Microcalorimetry study of the anaerobic growth of *Escherichia coli*: measurement of the affinity of whole cells for various energy substrates.

J. Bacteriol., **125**:19-24. (78)

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. (31)

Benno Y. and Mitsuoka T. 1992.

Impact of *Bifidobacterium longum* on human fecal microflora.

Microbiol. Immun. **36**:683-694. (47)

Benthin S., Nielsen J. and Villadsen J. 1994.

Galactose expulsion during lactose metabolism in *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* FD1 to dephosphorylation of intracellular galactose-6-phosphate.

Appl. Environ. Microbiol., **60**:1254-1259. (65)

Berrada N., Laroche G., Lemeland J.F. et Tonetti H. 1989.

Survie des bifidobactéries dans l'estomac de l'homme.

Les laits fermentés, Actualité de la recherche, Libbey, J., Eurotext, 259-260. (46)

Berzirtzoglou 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, France. (30, 46)

Bezkorovainy A., Grohlich D. and Nichols J.H. 1979.

Isolation of glycopeptide fraction with *Lactobacillus bifidus* subspecies *pennsylvanicus* growth promoting activity from whole human milk casein.

Amer. J. Clin. Nutrit., **32**:1428-1432. (37)

Bezkorovainy A. and Topouzian N. 1981.

B. bifidum var. *penn.* growth promoting of human milk casein and its derivatives.

Int. J. Biochem., **13**:585-590. (37)

Bezkorovainy A. and Topouzian N. 1983.

Aspects of iron metabolism in *Bifidobacterium bifidum* var. *pennsylvanicus*.

Int. J. Biochem., **15**:361-366. (35)

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. (35)

Bezkorovainy A., Solberg L., Miller-Catchpole R. and Poch M. 1988.

Transport of ferrous iron and lactate production by bifidobacteria.

Biol. Trace Element Res., **17**:123-137. (35)

Bezkorovainy A. 1989.

Structural components of bifidobacteria.

In "Biochemistry and physiology of bifidobacteria", pp. 131-145, Bezkorovainy, A. and Miller-Catchpole, R. (Eds.), CRC Press. (25,35)

Biavati B., Scardovi V. and Moore W.E.C. 1982.

Electrophoretic patterns of proteins in the genus *Bifidobacterium* and proporsal of four new species.

Int. J. Syst. Bacteriol., **32**:358-373. (26)

Biavati B., Castagnoli P., Crocianni F. and Trovatelli L.D. 1984.

Species of *Bifidobacterium* in the feces of infants.

Microbiol., **7**:341-345. (31, 33, 34)

Biavati B., Castagnoli P. and Trovatelli L.D. 1986.

Species of the genus *Bifidobacterium* in the feces of human adults.

Microbiol., **9**:39-45. (34)

Biavati B. and Mattarelli P. 1991.

Bifidobacterium ruminantium sp. nov. and *Bifidobacterium merycicum* sp. nov. from the rumen of cattle.

Int. J. Syst. Bacteriol., **41**:163-168. (29)

Biavati B., Mattarelli P. and Crociani F. 1991.

Bifidobacterium saeculare: a new species isolated from feces of rabbit.

System. Appl. Microbiol., **14**:389-392. (29)

Biavati B., Sgorbati B. and Scardovi V. 1992a.

In "The prokaryotes-A handbook on the biology of bacteria : Ecophysiology, isolation, identification, applications, 2nd ed, Vol. 1, pp. 816-833, A., Barlows; Trüper, H.G.; Dworkin, M.; Harder, W. and Schleifer, K-H. (Eds.), Springer-Verlag, NewYork. (39)

Biavati B., Sozzy T., Mattarelli P. and Trovatelli L.D. 1992b.

Survival of bifidobacteria from human habitat in acidified milk.

Microbiologica, **15**:197-200. (46)

Bouhnik Y., Pochart 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. (46, 47)

Bouhnik Y. 1993.

Survie et effets chez l'homme des bactéries ingérées dans les laits fermentés.

Lait, **73**:241-247. (47)

Bourassa S. and Vadeboncoeur C. 1992.

Expression of an inducible enzyme II fructose and activation of a cryptic enzyme II glucose in glucose-grown cells of spontaneous mutants of *Streptococcus salivaris* lacking the low-molecular-mass form of III_{man}, a component of the phosphoenolpyruvate:mannose phosphotransferase system.

J. Gen. Microbiol., **138**:769-777. (60)

Bradford M. 1976.

A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

Anal. Biochem, **72**:248-254. (77)

Brook I. 1984.

Anaerobic infections in childhood.

Rev. Infect. Dis., **6 Suppl.1**:S187-192. (77)

Buchanan R.E. and Gibbons N.E. 1974.

In "Bergey's manual of determination bacteriology", 8th Ed., Williams and Wilkins, Baltimore. (15, 21)

Buckley N.D. and Hamilton I.R. 1994.

Vesicles prepared from *Streptococcus mutans* demonstrate the presence of a second glucose transport system.

Microbiol., **140**:2639-2648. (58)

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. (30)

Calamia J. and Manoil C. 1990.

Lac permease of *Escherichia coli* topology and sequence elements promoting membrane insertion.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **87**:4937-4941. (57)

Chassy B.M. and Thompson J. 1983a.

Regulation of the lactose-phosphoenolpyruvate-phosphotransferase system and β -D-phosphogalactoside galactohydrolase activities in *Lactobacillus casei*.

J. Bacteriol., **154**:1195-1203. (57)

Chassy B.M. and Thompson J. 1983b.

Regulation and characterization of the galactose-phosphoenolpyruvate-phosphotransferase system in *Lactobacillus casei*.

J. Bacteriol., **154**:1204-1214. (59)

Choi Y.J., Kim C.J. and Ji G.E. 1996.

A partially purified β -glucosidase from *Bifidobacterium adolescentis* converts lycasin to a mutagenic compound.

Lett. Appl. Microbiol., **22**:145-148. (38)

Chow J.M. and Russel J.B. 1990.

Effect of ionophores and pH on growth of *Streptococcus bovis* in batch and continuous culture.

Appl. Environ. Microbiol., **56**:1588-1593. (114, 128, 144)

Conchie J. 1954.

β -glucosidase from rumen liquor-preparation, assay and kinetics of action.

Biochem. J., **58**:552-560. (77)

Crociani F., Alessandrini A., Mucci M.M. and Biavati B. 1994.

Degradation of complex carbohydrates by *Bifidobacterium* spp..

Int. J. Food Microbiol., **24**:199-210. (12, 38, 39)

Crociani F., Biavati B., Alessandrini A., Chiarini C. and Scardovi V. 1996.

Bifidobacterium inopinatum sp. nov. and *Bifidobacterium denticolens* sp. nov., two new species isolated from human dental caries.

Int. J. Syst. Bacteriol., **46**:564-571. (26, 27, 28)

Cummins C.S., Glendenning O.M. and Harris H. 1957.

Composition of cell wall of *Lactobacillus bifidus*.

Nature, **180**:337-338. (18)

Cvitkovitch D.G., Boyd D.A. and Hamilton I.R. 1995a.

Regulation of sugar transport via the multiple sugar metabolism operon of *Streptococcus mutans* by the phosphoenolpyruvate phosphotransferase system.

J. Bacteriol., **177**:5704-5706. (64)

Cvitkovitch D.G., Boyd D.A., Thevenot T. and Hamilton I.R. 1995b.

Glucose transport by a mutant of *Streptococcus mutans* unable to accumulate sugars via the phosphoenolpyruvate phosphotransferase system.

J. Bacteriol., **177**:2251-2258. (58)

de Crécy-Lagard V., Lejeune P., Bouvet O.M. and Danchin A. 1991.

Identification of two fructose transport and phosphorylation pathways in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*.

Mol. Gen. Genet., **227**:465-472. (130)

de Crécy-Lagard V., Binet M. and Danchin A. 1995.

Fructose phosphotransferase system of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: characterization of the fruB gene.

Microbiol., **141**:2253-2260. (60)

Degnan B.A. and Macfarlane G.T. 1991.

Comparison of carbohydrate substrate preferences in eight species of bifidobacteria.

FEMS Microbiol. Lett., **84**:151-156. (148)

Degnan B.A. and Macfarlane G.T. 1993.

Transport and metabolism of glucose and arabinose in *Bifidobacterium breve*.

Arch. Microbiol., **160**:144-151. (107, 109, 153)

Degnan B.A. and Macfarlane G.T. 1994.

Synthesis and activity of α -glucosidase produced by *Bifidobacterium pseudolongum*.

Curr. Microbiol., **29**:43-47. (39)

Degnan B.A. and Macfarlane G.T. 1995.

Arabinogalactan utilization in continous cultures of *Bifidobacterium longum* : effect of co-culture with *Bacteroides thetaiotaomicron*.

Anaerobe, **1**:103-112. (38, 39)

Deguchi Y., Morishita T. and Mutai M. 1985.

Comparative studies on the synthesis of water-soluble vitamins among human species of bifidobacteria.

Agric. Biol. Chem., **49**:13-19. (35, 46)

Desjardins M-L., Roy D. and Goulet J. 1990.

Growth of bifidobacteria and their enzyme profiles.

J. Dairy Sci., **73**:299-307. (39)

Deutscher J., Kessler U., Alpert C.A. and Hengstenberg W. 1984.

Bacterial phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system: P-Ser-HPr and its possible regulatory function.

Biochem., **23**:4455-4460. (65)

De Vries W. and Stouthamer A.H. 1967.

Pathway of glucose fermentation in relation to the taxonomy of bifidobacteria.

J. Bacteriol., **93**:574-576. (39)

De Vries W., Gerbrandy Sj. J. and Stouthamer A.H. 1967.

Carbohydrate metabolism in *Bifidobacterium bifidum*.

Biochim. Biophys. Acta, **136**:415-425. (114, 150)

De Vries W. and Stouthamer A.H. 1968.

Fermentation of glucose, lactose, galactose, mannitol and xylose by bifidobacteria.

J. Bacteriol., **96**:472-478. (40)

De Vries W. and Stouthamer A.H. 1969.

Factors determining the degree of anaerobiosis of *Bifidobacterium* strains.

Arch. Mikrobiol., **65**:275-287. (23)

Dills S.S., Apperson A., Schmidt M.R. and Saier M.H. jr. 1980.

Carbohydrate transport in bacteria.

Microbiol. Rev., **44**:385-418. (52)

Djouzi Z. 1994.

Influence des probiotiques et des prébiotiques sur la composition et le métabolisme de la microflore humaine implantée chez le rat hétéroxénique.

Thèse, Université de Paris, France. (37)

Doelle H.W. 1969.

Bacterial metabolism, pp. 256-306, Academic press, New york and London. (40)

Dron D., Krzewinski F., Brassart C. and Bouquelet S.

Phosphorylase from *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082 : Characterization, partial purification and relation to mucin degradation.

soumis à publication dans J. Biol. Chem. (97, 144)

Dubreuil J.D., Jacques M., Brochu D., Frenette M. and Vadeboncoeur C. 1996.

Surface location of HPr, a phosphocarrier of the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system in *Streptococcus suis*.

Microbiol., **142**:837-843. (60)

Exterkate F.A. and Veerkamp J.H. 1969.

Composition of lipids of *Bifidobacterium bifidum*.

Biochim. Biophys. Acta, **176**:65-77. (15)

Exterkate F.A., Vassenberg H-W., Otten B.J. and Veerkamp J.H. 1971.

Comparison of the lipid composition of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*.

J. Bacteriol., **106**:824-829. (15)

Faure J.C., Schellenberg D., Bexter A. and Wurzner H.P. 1982.

Barrier effect of *Bifidobacterium longum* on *Escherichia coli* in the germ-free rat.

Int. J. Vit. Nutrit. Res., **52**:225-230. (47)

Finegold S.M. 1977.

Anaerobic bacteria in human disease, pp. 128-159, Academic Press, New York. (43, 45)

Foucaud C. and Poolman B. 1992.

Lactose transport system of *Streptococcus thermophilus*. Functional reconstitution of the protein and characterization of the kinetic mechanism of transport.

J. Biol. Chem., **267**:22087-22094. (57)

Franklund C.V. and Glass T.L. 1987.

Glucose uptake the cellulolytic ruminal anaerobe *Bacteroides succinogenes*.

J. Bacteriol., **169**:500-506. (73, 109)

Fujiwara S., Kadooka Y., Hirota T. and Nakazato H. 1990.

Screening for mitogenic activity of food microorganisms and their skim milk culture supernatants.

J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci., **43**:203-206. (48)

Fuller R. 1992.

In "Probiotics", pp. 1-8, Fuller R. (Ed.), Chapman and Hall, London. (46)

Gachelin G. 1969.

A new assay of the phosphotransferase system in *Escherichia coli*.

Biochem. Biophys. Res. Commun., **34**:382-387. (75)

Gallagher I.H.C., Pearce E.I.F. and Hancock E.M. 1984.

The ureolytic microflora of immature dental plaque before and after rinsing with a urea-based mineralizing solution.

J. Dent. Res., **63**:1037-1039. (43)

Garro M.S., de Giori G.S., de Valdez G.F. and Oliver G. 1994.

α -D-galactosidase (EC 3.2.1.22) from *Bifidobacterium longum*.

Lett. Appl. Microbiol., **19**:16-19. (38)

Gauhe A., György P., Hoover J.R.E., Kühn 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. (36)

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. (21, 24, 48)

Gavini F., Van Esbroeck M., Touzel J.P. Fourment A. and Goossens H. 1996.

Detection of fructose-6-phosphate phosphoketolase (F6PPK), a key of the bifid shunt, in *Gardnerella vaginalis*.

Anaerobe, **2**:191-193. (25)

Geerse R.H., Ruig C.R., Schuitema A.R.J. and Postma P.W. 1986.

Relationship between pseudo-HPr and the PEP: fructose phosphotransferase system in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*.

Mol. Gen. Genet., **203**:435-444. (53)

Gibson G.R. and Wang X. 1994.

Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria.

J. Appl. Bacteriol., **77**:412-420. (46)

Gibson G.R. and Roberfroid M.B. 1995.

Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics.

J. Nutr., **125**:1401-1412. (13)

Glick M.C., Sall T., Zilliken F. and Mudd S. 1960.

Morphological changes of *Lactobacillus bifidus* var. *pennsylvanicus* produced by a cell-wall precursor.

Biochem. Biophys. Acta, **37**:361-363. (16)

Godelle D., Raibaud P. and Sacquet E. 1985.

β -glucuronidase activities of intestinal bacteria determined both *in vitro* and *in vivo* gnotobiotic rats.

Appl. Environ. Microbiol., **49**:682-685. (47)

Goncharova G.I., Semenova L.P., Kozlova E.P. and Liannoia D.M. 1979.

Effect of different types of newborn infant feeding on intestinal microbiocenosis.

Vopr. Pitan., **6**:49-53. (31)

Good T.A. and Bessman S.P. 1964.

Determination of glucosamine et galactosamine using borate buffer for modification of the Elson-Morgan and Morgan-Elson reactions.

Anal. Biochem., **9**:253-262. (71, 78)

Green S.L. 1978.

Case report, fatal anaerobic pulmonary infection due to *Bifidobacterium eriksonii*.

Postgrad. Med., **63**:187-188. (45)

Greenawalt J.W. and Whiteside T.L. 1975.

Mesosomes : membranous bacterial organelles.

Bacteriol. Rev., **39**:405-463. (20)

Grimmonprez L. et Montreuil J. 1968.

Etude physicochimique de 6 nouveaux oligosides isolés du lait de femme.

Bull. Soc. Chim. Biol., **50**:843-848. (36)

Guillard F., Appelbaum P.C. and Sparrow F.B. 1980.

Pyelonephritis and septicemia due to gram-positive rods similar to *corynebacterium* group E (aerotolerant *Bifidobacterium adolescentis*).

Ann. Intern. Med., **92**:635-636. (36)

Györgi P., Mello M., Torres F.E. and Barness L.A. 1953.

Growth promoting in rats by crude concentrate of the bifidus factor.

Proc. Soc. Exp. Biol. N.Y., **84**:464-467. (15)

Györgi P., Kühn R., Rose C.S. and Zilliken F. 1954a.

Bifidus factor II. Its occurrence in milk from different species and in other natural products.

Arch. Biochem. Biophys., **48**:202-208. (34)

Györgi P., Norris R.F. and Rose C.S. 1954b.

Bifidus factor I. Variant of *Lactobacillus bifidus* requiring a special growth factor.

Arch. Biochem. Biophys., **48**:193-201. (36)

Györgi P. and Rose C.S. 1955.

Further observations on metabolic requirement of *Lactobacillus bifidus* var. *pennsylvanicus*.

J. Bacteriol., **69**:483-490. (36)

Györgi P. 1957.

Nutrition and intestinal flora in man.

Ann. Nutr. Aliment, **11**:189-203. (15)

Habu Y., Nagaoka M., Yokokura T. and Azuma I. 1987.

Structural studies of cell wall polysaccharides from *Bifidobacterium breve* YIT 4010 and related *Bifidobacterium* species.

J. Biochem., **102**:1423-1432. (22, 107)

Haguenauer R. and Kepes A. 1972.

NaF inhibition of phosphorylation and dephosphorylation involved in α -methyl-D-glucose transport in *E. Coli* K 12. A pH dependent phenomenon sensitive to uncoupling agents.

Biochimie, **54**:505-512. (73)

Han M.K., Roseman S. and Brand L. 1987.

Sugar transport by the bacterial phosphotransferase system. Characterization of the sulfhydryl groups and site specific labelling of enzyme I.

J. Biol. Chem., **265**:1985-1995. (56)

Hassinen J.B., Durbin G.T., Tomarelli R.M. and Bernhart F.W. 1951.

The minimal nutritional requirements of *Lactobacillus bifidum*.

J. Bacteriol., **62**:771-777. (33)

Hawksworth G., Drasar B.S. and Hill M.J. 1971.

Intestinal bacteria and the hydrolysis of glycosidic bonds.

J. Med. Microbiol. **4**:451-459. (39)

Henderson P.J.F., McDonald T.P., Steel A., Litherland G.J., Cairns M.T. and Martin G.E.M. 1994.

The variability of kinetic parameters for sugar transport in different mutants of the galactose-H⁺ symport protein, GalP, of *Escherichia coli*.

Biochem. Soc. Trans., **22**:643-646. (59)

Hickey M.W., Hillier A.J. and Jago R.G. 1986.

Transport and metabolism of lactose, glucose, and galactose in homofermentative Lactobacilli.

Appl. Environ. Microbiol., **51**:825-831. (58, 109)

Higgins M.L., Parks L.C. and Daneo-Moore L. 1981.

The mesosome

In "Organization of prokaryotes cell membranes", Vol. 2, Ghosh, B.K. (Ed.), CRC Press, Boca Raton, FL. (20)

Hirano S., Hayashi H., Tirabayashi T., Onodera K., Iseki S., Kochide N., Nagai Y., Nakasaki T. and Imagawa T. 1968.

Biologically active glycopeptides in human colostrum.

J. Biochem., **64**:563-565. (58)

Hirayama B.A., Loo D.D.F. and Wright E.M. 1994.

Protons drive sugar transport through the Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1).

J. Biol. Chem., **269**:21407-21410.

Hoffman K., Mossel D.A.A., Korus W. and van de Kamer J.H. 1964.

Mode of action of lactulose (Beta-galactosido-fructose) in the intestine.

Klin. Wschr., **42**:126-130. (36)

Holland D.F. 1920.

Generic index of the commoner forms of bacteria.

J. Bacteriol., **5**:215-229. (15)

Homer K.A., Patel R. and Beighton D. 1993.

Effects of N-acetylglucosamine on carbohydrate fermentation by *Streptococcus mutans* NCTC 10449 and *Streptococcus sobrinus* SL-1.

Infect. Immun., **61**:295-302. (60)

Homma N. 1988.

Bifidobacteria as a resistance factor in human beings.

Bifidobacteria Microflora, **7**:35-43. (47)

Honeyman A.L. and Curtiss R. III 1993.

Isolation, characterization and nucleotide sequence of the *Streptococcus mutans* lactose-specific Enzyme EII (*lacE*) gene of the PTS and the phospho- β -galactosidase (*lacG*) gene.

J. Gen. Microbiol., **139**:2685-2694. (57)

Hoskins L.C. and Boulding E.T. 1981.

Mucin degradation in human colon ecosystems. Evidence for the existence and role of bacterial subpopulations producing glycosidases as extracellular enzymes.

J. Clin. Invest., **67**:163-172. (12)

Hoskins L.C., Boulding E.T., Gerken T.A., Harouny V.R. and Kriaris M.S. 1992.

Mucin glycoprotein degradation by mucin oligosaccharide-degrading strains of human faecal bacteria. Characterisation of saccharide cleavage products and their potential role in nutritional support of larger faecal bacterial populations.

Microbial Ecol. Health Dis., **5**:193-207. (12, 156)

Hove H., Nordgaard-Anderson I. and Brobech Mortensen P. 1994.

Effect of lactic acid bacteria on the intestinal production of lactate and short-chain fatty acids, and the absorption of lactose.

Am. J. Clin. Nutr., **59**:74-79. (47)

Hueck C. and Hillen W. 1995.

Catabolite repression in *Bacillus subtilis*: a global regulatory mechanism for the Gram-positive bacteria?

Mol. Microbiol., **15**:395-401. (64, 65)

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**:841-844. (18)

Imamura L., Hisamitsu K-I. and Bobashi K. 1994.

Purification and characterization of β -fructofuranosidase from *Bifidobacterium infantis*.

Biol. Pharm. Bull., 17:596-602. (39, 130)

Ito M., Degushi Y., Matsumoto K., Kimura M., Onodera N. and Yajima T. 1993.

Influence of galactooligosaccharides on the human faecal microflora.

J. Nutrit. Sci. Vitaminol., 39:635-640. (37)

Jaffor Ullah A.H. and Cirillo V.P. 1976.

Mycoplasma phosphoenolpyruvate-dependent sugar phosphotransferase system: purification and characterization of the phosphocarrier protein.

J. Bacteriol., 131:988-996. (53)

Kaback H.R. 1968.

The role of the phosphoenolpyruvate-phosphotransferase system in the transport of sugars by isolated membrane preparations of *Escherichia coli*.

J. Biol. Chem., 243:3711-3724. (59)

Kaback H.R., Frillingos S., Jung H., Jung K., Privé G.G., Ujwal M.L., Xeitman C., Wu J. and Zen K. 1994.

The lactose permease meets Frankenstein.

J. Exp. Biol., 196:183-195. (57)

Kageyama T., Tomada T. and Nakano Y. 1984.

The effect of *Bifidobacterium* administration in patients with leukemia.

Bifidobacteria Microflora, 3:29-33. (47)

Kandler O., Koch O. and Schleifer K.H. 1968.

Die aminosäuresequenz einer glycinhaltigen mureins einiger stämme von *Lactobacillus bifidus*.

Arch. Mikrobiol., 61:181-186. (18, 20, 25)

Kandler O. 1970.

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

Int. J. Syst. Bacteriol., 20:491-507. (24, 25)

Kandler O. and Lauer E. 1974.

Neuere vorstellungen zur taxonomie der bifidobakterien.

Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionstr. Hyg. Abt. 1: Orig., 228:29-45. (18, 20, 25, 27)

Kennedy E.P. 1970.

The lactose permease system of *Escherichia coli*.

In "The lactose operon", pp. 49-92, Beckwith, J.R. and Zipser, D. (Eds.), Cold Spring Harbor laboratory. (57)

Keevil C.W., Williamson M.I., Marsh P.D. and Ellwood D.C. 1984.

Evidence that glucose and sucrose uptake in oral streptococcal bacteria involves independent phosphotransferase and proton-motive force-mediated mechanisms.

Arch. Oral Biol., **29**:871-878. (73)

Kleessen B., Bunke H., Tovar K., Noack J. and Sawatzki G. 1995.

Influence of two infant formulas and human milk on the development of the faecal flora in the newborn infants.

Acta Pediatr., **84**:1347-1356. (31)

Koch O., Schleifer K.H. and Kandler O. 1970 a.

Die aminosäuresequenz des serin und asparaginsäure enthaltenden mureins von *Lactobacillus bifidus* Orla-Jensen.

Z. Naturforsch., **25**:1294- 1301. (20, 25)

Koch O., Schleifer K.H. and Kandler O 1970 b.

Die aminosäuresequenz des threonin und serin enthaltenden mureins von *Bifidobacterium longum* Reuter.

Arch. Mikrobiol., **74**:315- 325. (47)

Kohwi Y., Imai K., Tamura Z. and Hoshimota Y. 1978.

Antitumor effect of *Bifidobacterium infantis* in mice.

Gann, **69**:613-618. (47)

Kojima M., Suda S., Hotta S. and Hamada K. 1968.

Induction of pleomorphism in *Lactobacillus bifidus*.

J. Bacteriol., **95**:710-711. (16)

Kojima M., Suda S., Hotta S. and Hamada K. 1970a.

Induction of pleomorphism and calcium ion deficiency in *Lactobacillus bifidus*.

J. Bacteriol., **102**:217-220. (18)

Kojima M., Suda S., Hotta S., Hamada K. and Suganuma A. 1970b.

Necessity of calcium ion for cell division in *Lactobacillus bifidus*.

J. Bacteriol., **104**:1010-1013. (18)

Kornberg H.L. and Riordani C. 1976.

Uptake of galactose into *Escherichia coli* by facilitated diffusion.

J. Gen. Microbiol., **94**:75-89. (59)

Kornberg H.L. and Lambourne L.T. 1992.

Role of the phosphoenolpyruvate-dependent fructose phosphotransferase system in the utilization of mannose by *Escherichia coli*.

Proc. R. Soc. Lond., **250**:51-55. (60)

Korte T. and Hengstenberg W. 1971.

Purification and characterization of the inducible lactose-specific membrane-bound component of the Staphylococcal phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system.

Eur. J. Biochem., **23**:295-302. (60)

Kühn R. and Baer H.H. 1956.

Die konstitution der Lacto-N-tetraose.

Chem. Ber., **89**:504. (36)

Kühn R. 1958.

Les oligosaccharides du lait.

Bull. Soc. Chim. Biol., **40**:297-314. (36)

Kulkarni N. and Reddy B.S. 1994.

Inhibitory effect of *Bifidobacterium longum* cultures on the Azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation and fecal bacterial β -glucuronidase.

Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **207**:278-283. (47)

Kundig W., Ghosh S. and Roseman S. 1964.

Phosphate bound to histidine in a protein as an intermediate in a novel phospho-transferase system.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **52**:1067-1074. (53)

Kundig W. and Roseman S. 1971.

Sugar transport. I. Isolation of a phosphotransferase system from *Escherichia coli*.

J. Biol. Chem., **246**:1393-1406. (58)

Kurmann J.A. and Rasic J.L. 1991.

The health potential of products containing bifidobacteria.

In "Therapeutic properties of fermented milks", pp. 117-157, Robinson, R.K. (Ed.), Elsevier Applied Science, New York. (47)

Lauer E. and Kandler O. 1976.

Mechanismus der variation des verhältnisses acetat/lactat bei der vergärung von glucose durch bifidobakterien.

Arch. Mikrobiol., **110**:271-277. (40)

Lauer E. and Kandler O. 1983.

DNA-DNA homology, murein types, and enzyme patterns in the type strains of the genus *Bifidobacterium*.

System. Appl. Microbiol., **4**:42-64. (26)

Lauer E. 1990.

Bifidobacterium gallicum sp. nov. isolated from human feces.

Int. J. Syst. Bacteriol., **40**:100-102. (28)

Lauret R., Morel-Deville F., Berthier F., Champomier-Verges M., Postma P., Ehrlich S.D. and Zagorec M. 1996.

Carbohydrate utilization in *Lactobacillus sake*.

Appl. Environ. Microbiol., **62**:1922-1927. (61)

Lay L.L. and Fields M.L. 1981.

Nutritive value of germinated corn and corn fermented after germination.

J. Food Sci., **46**:1069-1073. (48)

Lee L., Kimura A. and Tochikura T. 1977.

Purification and properties of galactokinase from *Bifidobacterium bifidum*.

J. Ferment. Technol., **55**:19-26. (43)

Lee L., Kimura A. and Tochikura T. 1978.

Presence of a single enzyme catalysing the pyrophosphorolysis of UDP-glucose and UDP-galactose in *Bifidobacterium bifidum*.

Biochem. Biophys. acta, **527**:301-304. (43)

Lee L., Kinushita S., Kumagai H. and Tochikura T. 1980a.

Galactokinase of *Bifidobacterium bifidum*.

Agric. Biol. Chem., **44**:2961-2966. (43)

Lee L., Terao S. and Tochikura T. 1980b.

Variation of hexose-1-P uridyl transferase and UDP-Gal pyrophosphorylase in *Bifidobacterium bifidum* culture.

Agric. Biol. Chem., **44**:1647-1648. (43, 123)

Lee J., Ametani A., Enomoto A., Sato Y., Motoshima H., Ike F. and Kaminogawa S. 1993.

Screening for the immunopotentiating activity of food microorganisms and enhancement of the immune response by *Bifidobacterium adolescentis* M101-4.

Biosci. Biotech. Biochem., **57**:2127-2132. (48)

Leong-Morgenthaler P., Zwahlen M.C. and Hottinger H. 1991.

Lactose metabolism in *Lactobacillus bulgaricus*: analysis of the primary structure and expression of the genes involved.

J. Bacteriol., **173**:1951-1957. (57)

Lim K.S., Huh C.S. and Baek Y.J. 1993.

Antimicrobiol susceptibility of bifidobacteria.

J. Dairy Sci., **76**:2168-2174. (23)

Lineweaver H. and Burk D. 1934.

The determination of enzyme dissociation constants.

J. Am. Chem. Soc., **56**:658-666. (76)

Lowry P.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. 1951.

Protein measurement with the folin phenol reagent.

J. Biol. Chem., **193**:265-275. (77)

Lugoskaia 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. (33)

McGinnis J.F. and Paigen K. 1969.

Catabolite inhibition: a general phenomenon in the control of carbohydrate utilization.

J. Bacteriol., **100**:902-913. (61)

McKellar R.C. and Modler H.W. 1989.

Metabolism of fructo-oligosaccharides by *Bifidobacterium* spp.

Appl. Microbiol. Biotechnol., **31**:537-541. (37)

Malyoth G. and Bauer A. 1950.

Beobachtungen am *Bacterium bifidum*.

Z. Kinderheilkd., **68**:358-367. (24)

Manciaux M. 1958.

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

Thèse, Université de Nancy, France. (15)

Mara D.D. and Oragui J.D. 1983.

Sorbitol-fermenting bifidobacteria as specific indicators of human faecal pollution.

J. Appl. Bacteriol., **55**:349-357. (48)

Marteau P., Pochart P., Bouhnik 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. (46)

Mass L.K. and Glass T.L. 1990.

Cellulobiose uptake by the cellulolytic ruminal anaerobe *Fibrobacter* (*Bacteroides*) *succinogenes*.

Can. J. Microbiol., **37**:141-147. (73)

Matteuzi D., Crociani F., Zani G. and Trovatelli L.D. 1971.

Bifidobacterium suis n. sp.: a new species of the genus *Bifidobacterium* isolated from pig feces.

Z. Allg. Mikrobiol., **11**:387-395. (29)

Matteuzi D., Crociani F. and Enaldi O. 1978.

Amino acids produced by bifidobacteria and some clostridia.

Ann. Microbiol., **129**:175-182. (33, 46)

Matteuzi D., Crociani F. and Brigidi P. 1983.

Antimicrobial sensitivity of *Bifidobacterium*.

Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), **134A**:339-349. (23)

Meijer G.C.M., Kerkvliet H.M.M. and Toth F.N. 1994.

Non-invasive detection of micro-organisms using smart temperature sensors.

Sensors and Actuators B, **18-19**:276-281. (79)

Miller L.G. and Finegold S.M. 1967.

Antibacterial sensitivity of *Bifidobacterium* (*Lactobacillus bifidus*).

J. Bacteriol., **93**:125-130. (23)

Miller R.S. and Hoskins L.C. 1981.

Mucin degradation in human colon ecosystems. Fecal population densities of mucin-degrading bacteria estimated by a most probable number method.

Gastroenterol., **81**:759-765. (12)

Miller-Catchpole R. 1989.

Bifidobacteria in clinical microbiology and medecine.

In "Biochemistry and physiology of bifidobacteria", pp. 177-200, Bezkorovainy, A. and Miller-Catchpole, R. (Eds.), CRC Press, Boca Raton. (45)

Minagawa K. and Okada T. 1974.

An investigation on the possibility of lyzosome production by *Lactobacillus bifidus*.

Bull. Josai Dent. Univ., **3**:233-237. (46)

- Minami Y., Yazawa K., Tamura Z., Tanaka T. and Yamamoto T.** 1983.
Selectivity of utilization of galactosyl-oligosaccharides by *Bifidobacterium*.
Chem. Pharm. Bull., **31**:1688-1691. (37)
- Mitchell W.J., Misko T.P. and Roseman S.** 1982.
Sugar transport by the bacterial phosphotransferase system. Regulation of other transports systems (lactose and melibiose).
J. Biol. Chem, **257**:14553-14564. (57)
- Mitsuoka T.** 1969.
Vergleichende untersuchungen über die bifidobakterien aus dem verdauungstrakt von menschen und tieren .
Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Orig., **210**:52-64. (24, 26, 27, 29)
- Mitsuoka T. and Hayakawa** 1972.
Die faekal flora bei menschen : I. mitteilung : die zusammensetzung der faekalflora der verschiedenen altersgruppen.
Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Orig., **223**:333-342. (31, 34)
- Mitsuoka T. and Kaneuchi C.** 1977.
Ecology of the bifidobacteria.
Am. J. Clin. Nutr., **30**:1799-1810. (30, 32)
- Mitsuoka T.** 1982.
Recent trends in research in intestinal flora.
Bifidobacteria Microflora, **1**:3-24. (15)
- Mitsuoka T.** 1984.
Taxonomy and ecology of bifidobacteria.
Bifidobacteria Microflora, **3**:11-28. (15, 24)
- Mitzutani T. and Mitsuoka T.** 1979.
Effect of intestinal bacteria on incidence of liver tumors in gnotobiotic C3H/HE male mice.
J. Natl. Cancer Institute, **63**:1365-1370. (47)
- Montreuil J.** 1956.
Structure d'un tétraholoside isolé du lait de femme.
C. R. Acad. Sci., **242**:828. (36)
- 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**:745-753. (30)

Moro E. 1900.

Über *B. acidophilus* n. sp.

Jb. Kinderheik, **52**:38. (15)

Muramatsu K., Onodera S., Kikuchi M. and Shiomi N. 1993.

Purification and some properties of β -fructofuranosidase from *Bifidobacterium adolescentis* G1.

Biosci. Biotechnol. Biochem., **57**:1681-1685. (39, 130)

Muramatsu K., Onodera S., Kikuchi M. and Shiomi N. 1994.

Substrate specificity and subsite affinity of β -fructofuranosidase from *Bifidobacterium adolescentis* G1.

Biosci. Biotechnol. Biochem., **58**:1642-1645. (39)

Nagaoka M., Hashimoto S., Shibata H., Kimura I., Kimura K., Sawada H. and Yokokura T. 1995.

Structural studies on a cell wall polysaccharide from *Bifidobacterium longum* YIT4028.

Carbohydr. Res., **274**:245-249. (22)

Nagaoka M., Hashimoto S., Shibata H., Kimura I., Kimura K., Sawada H. and Yokokura T. 1996.

Structure of a galactan from cell walls of *Bifidobacterium catenulatum* YIT4016.

Carbohydr. Res., **281**:285-291. (22)

Nakazawa T., Kaneko K-I., Takahashi H. and Inoue S. 1996.

Neonatal meningitis caused by *Bifidobacterium breve*.

Brain Development, **18**:160-162. (43)

Nalecz M.J., Casey R.P. and Azzi A. 1986.

Use of N,N' dicyclohexylcarbodiimide to study membrane-bound enzymes.

In "Methods in Enzymology", Vol. 125, pp. 86-108, Fleischer, S. and Fleischer, B. (Eds.), Academic press, New York. (73, 114)

Neut C., Romond C. et Beerens H. 1981.

Idenfication des *Bifidobacterium* en fonction de leurs besoins nutritionnels.

Rev. Inst. Pasteur Lyon, **14**:19-26. (31)

Nichols I.H., Bezkorovainy A. and Landu W. 1974.

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

Life Sci., **14**:967-976. (37)

Noda H., Akasaka N. and Ohsugi M. 1994.

Biotin production by bifidobacteria.

J. Nutr. Sci. Vitaminol., **40**:181-188. (35, 46)

Okazaki N., Tsuda M., Wilson T.H. and Tsuchiya T. 1994.

Characterization of the lactose transport system in *Citrobacter freundii*.

Biol. Pharm. Bul., **17**:794-797. (57, 110)

Op den Camp H.J.M., Oosterhof A. and Veerkamp J.H. 1985.

Cell surface hydrophobicity of *Bifidobacterium bifidum* subsp. *pennsylvanicus*.

Antonie van Leeuwenhoek, J. Microbiol. Serol., **51**:303-312. (21)

Opekarova M., Caspari T. and Tanner W. 1994.

The HUP1 gene product of *Chlorella kessleri* : H⁺/glucose symport studied *in vitro*.

Biochim. Biophys. Acta, **1194**:149-154. (58)

Orla-Jensen 1924.

La classification des bactéries lactiques.

Lait, **4**:468-474. (15, 28)

Passerat B. and Desmaison A-M. 1995.

Lactase activity of *Bifidobacterium bifidum*.

Nutr. Res., **15**:1287-1295. (38)

Pellicione N., Jaffin B., Sobel M.E. and Krulwich T.A. 1979.

Induction of the phosphoenolpyruvate:hexose phosphotransferase system associated with relative anaerobiosis in an obligate aerobe.

Eur. J. Biochem., **95**:69-75. (109)

Perdigon G., Alvarez S., Nader de Marcias M.E. and Medici M. 1989.

Effect of lactic acid bacteria orally administered and yoghurt on the immune system.

Les laits fermentés, Actualité de la recherche, Libbey, J., Eurotext Ltd, Paris, 77-84. (47)

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. (31)

Petuely F. and Kristen G. 1949.

Changing the intestinal flora of infants (Short preliminary communication).

Ann. Paediat., **172**:183-184. (36)

Petuely F. and Kristen G. 1951.

Investigation of the bifidus factor. III. The bifidus factor, an essential active material for the infant.

Österr. Z. Kinderheilk. Kinderfürsorge, **6**:173-190. (36)

Petuely F. 1956.

A simple synthetic selective medium for *Lactobacillus bifidus*.

Zbl. Bakt., **166**:95-99. (15)

Petuely F. 1966.

Bifidus-active substance and bifidus-active food preparation.

U. S. Pat. 3, **239**:358. (36)

Plumbridge J.A. 1990.

Induction of the *nag* regulon of *Escherichia coli* by N-acetylglucosamine and glucosamine : role of the cyclic AMP-catabolite activator protein complex in expression of the regulon.

J. Bacteriol., **172**:2728-2735. (66)

Plumbridge J.A. 1991.

Repression and induction of the *nag* regulon of *Escherichia coli* K12: the role of *nagC* and *nagA* in maintenance of the uninduced state.

Mol. Microbiol., **5**:2053-2062. (66)

Pochart P., Marteau P., Bouhnik 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. (46)

Polonovski M. et Lespagnol A. 1930.

Un nouveau constituant du lait de Femme : le gynolactose.

C. R. Soc. Biol., **104**:553-555. (36)

Postma P.W., Lengeler J.W. and Jacobson G.R. 1993.

Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria.

Microbiol. Rev., **57**:543-594. (56)

Postma P.W., Lengeler J.W. and Jacobson G.R. 1996.

Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems.

In "*Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and molecular biology", pp. 1149-1174,

Neidhardt, F.C. (Ed.), ASM Press, Washington D.C. (60)

Poupard J.A., Husain I. and Norris R.F. 1973.

Biology of bifidobacteria.

Bact. Rev., **37**:136-165. (16, 24, 31, 46)

Ramseier T.M., Bledig S., Michotey V., Feghali R. and Saier M.H. Jr. 1995.

The global regulatory protein, FruR, modulates the direction of carbon flow in enteric bacteria.

Mol. Microbiol., **16**:1157-1169. (64)

Rasic J.L. and Kurmann J.A. 1983.

Bifidobacteria and their role. Microbiological, nutritionnal, physiological, medical and technological aspects and bibliography.

Experientia supplement 39, Ed Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Stuttgart. (23)

Raynaud M., Mate-Levy J. and Rouillon N. 1959.

The bifidus factor 2.

Ann. Pediat., **6**:250-255. (15, 36)

Raynaud M. and Bizzini N. 1971.

Purification and properties of bifidus factor 2.

Ann. Nutrit. Aliment., **25**:209-223. (36)

Reddy B.S. and Rivenson A. 1993.

Inhibitory effect of *Bifidobacterium longum* on colon, mammary, and liver carcinogenesis induced by 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*] quinoline, a food mutagen.

Cancer Res., **53**:3914-3918. (47)

Reizer J., Peterkofsky A. and Romano A.H. 1988.

Evidence for the presence of heat stable protein (HPr) and ATP-dependent HPr kinase in heterofermentative lactobacilli lacking a phosphoenolpyruvate: glycolate phosphotransferase activity.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **85**:2041-2045. (53)

Reizer J., Ramseier T.M., Reizer A., Charbit A. and Saier M.H. jr. 1996.

Novel phosphotransferase genes revealed by bacterial genome sequencing: a gene cluster encoding a putative N-acetylgalactosamine metabolic pathway in *Escherichia coli*.

Microbiol., **142**:231-250. (61)

Resnick I.J. and Levin M.A. 1981.

Assessment of bifidobacteria as indicators of human fecal pollution.

Appl. Environ. Microbiol., **42**:427-432. (48)

Reuter G. 1963.

Vergleichende untersuchungen über die bifidus-flora im säuglings und erwachsenenstuhl.

Zentralbl. Bakteriол. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Orig., **191**:486-507. (15, 24, 28)

Reuter G. 1971.

Designation of type strains for *Bifidobacterium* species.

Int. J. Syst. Bacteriol., **21**:273-275. (15)

Richarme G., El Yaagoubi A. and Kohiyama M. 1993.

The MGIA component of the binding protein-dependent galactose transport system of *Salmonella typhimurium* is a galactose stimulated ATPase.

J. Biol. Chem., **268**:9473-9477. (59)

Rimington C. 1931.

Carbohydrate complex of the serum proteins. II. Improved method for isolation and redetermination of glucoaminodiamannose from proteins of ox blood.

Biochem. J., **25**:1062-1071. (70, 78)

Romano A.H., Trifone J.D. and Brustolon M. 1979.

Distribution of the phosphoenolpyruvate:glucose phosphotransferase system in fermentative bacteria.

J. Bacteriol., **139**:93-97. (107)

Romond C., Beerens H., Neut C. et Monteuil J. 1980.

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

Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), **131A**:309-314. (31)

Rose C.S., Kühn R. Zilliken F. and György P. 1954.

Bifidus Factor. V. The activity of α - and β -methyl-N-acetyl-D-glucosaminides.

Arch. Biochem. Biophys., **49**:123-129. (95, 152)

Rose C.S. and György P. 1963.

Bifidus factor 2 for growth of *Lactobacillus bifidus*.

Proc. Soc. Exp. Biol. N. Y., **112**:923-926. (36)

Rowland I.R. and Tanaka R. 1993.

The effects of transgalactosylated on gut flora metabolism in rats associated with human faecal microflora.

J. Appl. Bacteriol., **74**:667-674. (37)

Russel J.B. 1990.

Low-affinity, high-capacity system of glucose transport in the ruminal bacterium *Streptococcus bovis* : evidence for a mechanism of facilitated diffusion.

Appl. Environ. Microbiol., **56**:3304-3307. (58)

Saier M.H. jr., Feucht B.U. and Roseman S. 1971.

Phosphoenolpyruvate-dependent fructose phosphorylation in phosphosynthetic bacteria.

J. Biol. Chem., **246**:7819-7821. (59)

Saier M.H. jr. 1996.

Cyclic AMP-independent catabolite repression in bacteria.

FEMS Microbiol. letters, **138**:97-103. (64, 115)

Saier M.H. jr., Chauvaux S., Cook G.M., Deutscher J., Paulsen I.T., Reizer J. and Ye J-J. 1996a.

Catabolite repression and inducer control in Gram-positive bacteria.

Microbiol., **142**:217-230. (65, 66)

Saier M.H. jr., Ye J-J., Klinke S. and Nino E. 1996b.

Identification of an anaerobically induced phosphoenolpyruvate-dependent fructose-specific phosphotransferase system and evidence for the Emden-Meyerhof glycolytic pathway in the heterofermentative bacterium *Lactobacillus brevis*.

J. Bacteriol., **178**:314-316. (60, 65)

Sakai K., Tachiki T., Kumagai H. and Tochikura T. 1986.

Isolation and characterization of two β -D-glucosidases from *Bifidobacterium breve* 203.

Agric. Biol. Chem., **50**:2287-2293. (38)

Sakai K., Tachiki T., Kumagai H. and Tochikura T. 1987a.

Hydrolysis of α -D-galactosyl oligosaccharides in soil milk by α -D-galactosidases of *Bifidobacterium breve* 203.

Agric. Biol. Chem., **51**:315-322. (38)

Sakai K., Tanaka M., Tachiki T., Kumagai H. and Tochikura T. 1987b.

Increase in β -D-glucoside-assimilating ability of *Bifidobacterium breve* 203 due to acclimation to β -D-glucoside.

Agric. Biol. Chem., **51**:689-705. (38)

Sapico F.L., Wideman P.A. and Finegold S.M. 1976.

Aerobic and anaerobic flora in bladder urine of patients with indwelling urethral catheters.

Urology, **7**:382-384. (45)

Sarker R.I., Ogawa W., Tsuda M., Tanaka S. and Tsushiya T. 1994.

Characterization of a glucose transport system in *Vibrio parahaemolyticus*.

J. Bacteriol., **176**:7378-7382. (58, 100, 103)

Sarker R.I., Ogawa W., Tsuda M., Tanaka S. and Tsushiya T. 1996.

- Properties of Na⁺/galactose (glucose) symport system in *Vibrio parahaemolyticus*.
Biochim. Biophys. Acta, **1281**:149-156. (59)
- Scardovi V. and Trovatelli L.D.** 1965.
The fructose-6-phosphate shunt as peculiar pattern of hexose degradation in the genus *Bifidobacterium*.
Ann. Microbiol., **15**:19-29. (24, 39)
- Scardovi V., Trovatelli L.D., Crociani F. and Sgorbati B.** 1969.
Bifid bacteria in bovine rumen. New species of the genus *Bifidobacterium*: *B. globosum* n. sp. and *B. ruminale* n. sp.
Arch. Microbiol., **68**:278-294. (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*.
Zentrabl. Bakteriell. Parasitenkd. Infektionskr. Abt. 2, **123**:64-88. (23, 29)
- Scardovi V., Zani G. and Trovatelli L.D.** 1970.
Deoxyribonucleic acid homology among the species of the genus *Bifidobacterium* isolated from animals.
Arch. Microbiol., **72**:318-325. (15, 24, 26)
- Scardovi V., Sgorbati B. and Zani G.** 1971a.
Starch gel electrophoresis of fructose-6-phosphate phosphoketolase in the genus *Bifidobacterium*.
J. Bacteriol., **106**:1036-1039. (25)
- Scardovi V., Trovatelli L.D., Zani G., Crociani F. and Mateuzzi D.** 1971b.
Desoxyribonucleic acid homology relationships among species of the genus *Bifidobacterium*.
Int. J. Syst. Bacteriol., **21**:276-294. (26)
- Scardovi V.** 1974.
Bifidus bacteria : taxonomy. Therapeutic and nutritional role of *Lactobacillus*.
Int. Sem. Roma, **8**:10-15. (15)
- Scardovi V. and Crociani F.** 1974.
Bifidobacterium catenulatum, *Bifidobacterium dentium*, and *Bifidobacterium angulatum*: three new species and their deoxyribonucleic acid homology relationships.
Int. J. Syst. Bacteriol., **24**:6-20. (24, 26, 28, 29)
- Scardovi V. and Sgorbati B.** 1974.

Electrophoretic types of transaldolase, transketolase, and other enzymes in bifidobacteria.

Antonie van Leeuwenhoek; J. Microbiol. Serol., **40**:427-440. (25, 39)

Scardovi V. and Trovatelli L.D. 1974.

Bifidobacterium animalis (Mitsuoka) comb. nov. and the "*minimum*" and "*subtile*" groups of new bifidobacteria found in sewage.

Int. J. Syst. Bacteriol., **24**:21-28. (28)

Scardovi V. and Zani G. 1974.

Bifidobacterium magnum sp. nov., a large acidophilic *Bifidobacterium* isolated from rabbit feces.

Int. J. Syst. Bacteriol., **24**:29-34. (29)

Scardovi V. , Casalicchio F. and Vincenzi N. 1979a.

Multiple electrophoretic forms of transaldolase and 6-phosphogluconate dehydrogenase and their relationships to the taxonomy and ecology of bifidobacteria.

Int. J. Syst. Bacteriol., **29**:312-329. (25, 30)

Scardovi V. Trovatelli L.D., Biavati B. and Zani G. 1979b.

Bifidobacterium cuni, *Bifidobacterium chorinum*, *Bifidobacterium boum*, and *bifidobacterium pseudocatenulatum*: four new species and their deoxyribonucleic acid homology relationships.

Int. J. Syst. Bacteriol., **29**:291-311. (26, 28, 29)

Scardovi V. 1986.

Genus *Bifidobacterium*.

In "Bergey's manual of determination bacteriology", 9th Ed., Williams and Wilkins, Baltimore. (21, 23, 26, 39, 68)

Schrecker O. and Hengstenberg W. 1971.

Purification of the lactose specific factor III of the Staphylococcal PEP dependent phosphotransferase system.

FEBS Letters, **13**:209-212. (57)

Sebald M.F., Gasser F. and Werner H. 1965.

DNA base composition and classification. Application to group of bifidobacteria and to related genera.

Ann. Inst. Pasteur, **109**:251-269. (15, 24)

Seka Assi N. 1982.

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

Thèse, Université de Lille, France. (36, 91)

- Sekine K., Toida T., Saito M., Kuboyama M., Kawashima T. and Hashimoto Y.** 1985.
A new morphologically characterized cell wall preparation (whole peptidoglycan) from *Bifidobacterium infantis* with a higher efficacy on the regression of an established tumor in mice.
Cancer Res., **45**:1300-1307. (21, 48)
- Sekine K., Kawashima T. and Hashimoto Y.** 1994a.
Comparison of the TNF- α levels induced by human-derived *Bifidobacterium longum* and rat-derived *Bifidobacterium infantis* in mouse peritoneal cells.
Bifidobacteria Microflora, **2**:79-89. (48)
- Sekine K., Watanabe-Sekine E., Ohta J., Toida T., Tatsuki T., Kawashima T. and Hashimoto Y.** 1994b.
Induction and activation of tumoricidal cells *in vivo* and *in vitro* by the bacterial cell wall of *Bifidobacterium infantis*.
Bifidobacteria Microflora, **2**:65-77. (48)
- Sekine K., Watanabe-Sekine E., Toida T., Kasashima T., Kataoka T., Kawashima T. and Hashimoto Y.** 1994c.
Adjuvant activity of the cell wall of *Bifidobacterium infantis* for *in vitro* in mice.
Immunopharmacology and Immunotoxicology, **16**:589-609. (48)
- Sekine K., Ohta J., Onishi M., Tatsuki T., Shimokawa Y., Toida T., Kawashima T. and Hashimoto Y.** 1995.
Analysis of antitumor properties of effector cells stimulated with a cell wall preparation (WPG) of *Bifidobacterium infantis*.
Biol. Pharm. Bull., **18**:148-153. (48)
- Sgorbati B. and London J.** 1982.
Demonstration of phylogenetic relatedness among members of the genus *Bifidobacterium* by means of the enzyme transaldolase as an evolutionary marker.
Int. J. Syst. Bacteriol., **32**:37-42. (26, 27)
- Simoni R.D., Nakazawa T. Hays J.B. and Roseman S.** 1973.
Sugar transport. IV. Isolation and characterization of the lactose phosphotransferase system in *Staphylococcus aureus*.
J. Biol. Chem., **248**:932-940. (57)
- Smart J.B.** 1993.
In "Proceeding of IDF workshop on lactose hydrolysis", pp.12-16, Brussels : IDF, International Dairy Federation bulletin no. 289. (37)

Stark P.L. and Lee A. 1982.

The bacterial colonization of the large bowel of preterm low birth weight neonates.

J. Hyg., **89**:59-67. (31)

Stevenson D.K., Yang C., Kerner J.A. and Yager A.S. 1985.

Intestinal flora in the second week of life in hospitalized preterm infants fed stored frozen breast milk or a proprietary formula.

Clin. Pediatr., **24**:338-341. (31)

Stone H., Kolb L.D. and Geheber C.E. 1975.

Incidence and significance of intraperitoneal anaerobic bacteria.

Ann. Surg., **181**:705-715. (45)

Symons H. 1994.

Les Bifidobactéries.

World Newsletter Danone n°3. (50)

Tahri K., Crociani F., Ballongue J. and Schneider F. 1995.

Effects of three strains of bifidobacteria on cholesterol.

Letters Appl. Microbiol., **21**:149-151. (47)

Tahri K., Grill J-P. and Schneider F. 1996.

Bifidobacteria strain behavior toward cholesterol : coprecipitation with bile salts and assimilation.

Curr. Microbiol., **33**:187-193. (47)

Takano J-I., Kaidoh K. and Kamo N. 1995.

Fructose transport by *Haloferax volcanii*.

Can. J. Microbiol., **41**:241-246. (60)

Tamura Z. 1983.

Nutrition of bifidobacteria.

Bifidobacteria Microflora, **2**:3-16. (46)

Tangney M., Priest F.G. and Mitchell W.J. 1993.

Two glucose transport in *Bacillus licheniformis*.

J. Bacteriol., **175**:2137-2142. (58)

Tangney M., Tate J.E., Priest F.G. and Mitchell W.J. 1996.

Glucose transport in stationary-phase culture of an asporogenous strain of *Bacillus licheniformis*.

Appl. Environ. Microbiol., **62**:732-734. (58, 109)

Tanaka R., Takayana H., Morovomi M., Kuroshima T., Ueyama S., Matsumoto K. and Matai M. 1983.

Effect of administration of TOS and *Bifidobacterium breve* 4006 on the human fecal flora. *Bifidobacteria Microflora*, **2**:17-24. (37)

ten Brink B. and Konings W.N. 1986.

Generation of a proton motive force in anaerobic bacteria by end-product efflux. *Methods Enzymol.*, **125**:492-510. (117)

Teragushi S., Ono J., Kiyosawa I., Fukuwatari Y., Araki J. and Okonogi I.S. 1986.

Vitamin production by bifidobacteria originated from human intestine. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*, **32**:157-169. (47)

Thomas A.V., Sodeman T.H. and Bentz R.R. 1974.

Bifidobacterium (Atinomyces) eriksonii infection. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **110**:663-666. (45)

Tillmans J. and Philippi K. 1929.

Carbohydrate content of the important proteins of food stuffs and a colorimetric procedure for the quantitative determination of N-free sugar in protein. *Biochem. Z.*, **215**:36-60. (70)

Tissier H. 1900.

Recherches sur la flore intestinale des nourrissons (état normal et pathologique). Thèse, Université de Paris, France. (15, 16)

Titgemeyer F., Walkenhorst J., Reizer J., Stuiver M.H., Cui X. and Saier M.H. jr. 1995.

Identification and characterization of phosphoenolpyruvate:fructose phosphotransferase systems in three *Streptomyces* species. *Microbiol.*, **141**:51-58. (60)

Tochikura T., Sakai K., Fujiyoshi T., Tachiki T. and Kumagai H. 1986.

p-nitrophenyl glycoside-hydrolysing activities in bifidobacteria and characterization of β -D-galactosidase of *Bifidobacterium longum* 401. *Agric. Biol. Chem.*, **50**:2279-2286. (38)

Tone-Shimokawa Y., Toida T. and Kawashima T. 1996.

Isolation and structural analysis of polysaccharide containing galactofuranose from the cell walls of *Bifidobacterium infantis*. *J. Bacteriol.*, **178**:317-320. (22)

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. (35)

Trovatelli L.D., Crociani F., Pedinotti M. and Scardovi V. 1974.

Bifidobacterium pullorum sp. nov.: a new species isolated from chicken feces and a related group of bifidobacteria isolated from rabbit feces.

Arch. Microbiol., **98**:187-198. (29)

Ueda M., Mokamoto S., Nakar R. and Tagagi A. 1983.

Establishment of defined minimal medium and isolation of auxotrophic mutants for *B. bifidum* ES5.

J. Gen. Appl. Microbiol., **29**:103-114. (35)

Vaisman I., Krasik L. and Sazonova L.A. 1978.

Fine structure of *Bifidobacterium bifidum*.

Mikrobiologiya, **47**:924-931. (20)

Vaughan E.E., David S. and De Vos W.M. 1996.

The lactose transporter in *Leuconostoc lactis* is a new member of the LacS subfamily of galactoside-pentose-hexuronic translocators.

Appl. Environ. Microbiol., **62**:1574-1582. (57)

Veerkamp J.H., Lambert R. and Saito Y. 1965.

The composition of the cell wall of *Lactobacillus bifidus* var. *pennsylvanicus*.

Arch. Biochem. Biophys., **112**:120-125. (18, 25)

Veerkamp J.H. 1969a.

Uptake and metabolism of derivation of 2-deoxy-2-aminoglucose in *Bifidobacterium bifidum* var. *pennsylvanicus*.

Arch. Biochem. Biophys., **129**:248-256. (43, 45)

Veerkamp J.H. 1969b.

Catabolism of glucose and derivatives of 2-deoxy-2-aminoglucose in *Bifidobacterium bifidum* var. *pennsylvanicus*.

Arch. Biochem. Biophys., **129**:257-263. (43, 45)

Veerkamp J.H. 1971.

The structure of the cell wall peptidoglycan of *Bifidobacterium bifidum* var. *pennsylvanicus*.

Arch. Biochem. Biophys., **143**:204-211. (18, 25)

Veerkamp J.H., Hoelen G.E.J.M. and Op den Camp H.J.M. 1983.

The structure of a mannitol teichoic acid from *Bifidobacterium bifidum* var. *pennsylvanicus*.

Biochim. Biophys. Acta, **755**:439-451. (18, 21, 22, 107)

Veyrat A., Monedero V. and Perez-Martinez G. 1994.

Glucose transport by the phosphoenolpyruvate : mannose phosphotransferase system in *Lactobacillus casei* ATCC393 and its role in carbon catabolite repression.

Microbiol., **140**:1141-1149. (58)

von Nicolai H. and Zilliken F. 1972.

Neuraminidase aus *Lactobacillus bifidus* var. *pennsylvanicus*.

Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **353**:1015-1016. (36, 39)

von Nicolai H., Esser P. and Lauer E. 1981.

Partial purification and properties of a neuraminidase from *Bifidobacterium lactentis*.

Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **362**:153-162. (39)

von Nicolai H. and Zilliken F. 1984.

Partial purification and properties of β -galactosidase from *Bifidobacterium bifidum* subspecies *pennsylvanicus*.

Microbios letters, **25**:29-34. (38)

Wang X. and Gibson G.R. 1993.

Effects of the *in vitro* fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine.

J. Appl. Bacteriol., **75**:373-380. (37)

Watabe J., Benno Y. and Mitsuoka T. 1983.

Bifidobacterium gallinarum sp. nov.: a new species isolated from ceca of chickens.

Int. J. Syst. Bacteriol., **33**:127-132. (29)

Waygood E.B. 1980.

Resolution of the phosphoenolpyruvate : fructose phosphotransferase system of *Escherichia coli* into two components : enzyme II^{fructose} and fructose-induced HPr-like protein (FPr).

Can. J. Biochem., **58**:1144-1146. (53)

Waygood E.B. 1986.

Enzyme I of the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system has two sites of phosphorylation per dimer.

Biochemistry, **25**:4085-4090. (56)

Wayne L.G., Brenner D.J., Colwell R.R., Grimont P.A.D., Kandler O., Krichevsky M.I., Moore L.H., Moore W.E.C., Murray R.G.E., Stackebrandt E. and Starr M.P. 1987.

Report on the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics.

Int. J. Syst. Bacteriol., **37**:463-464. (20)

Weickert M.J. and Adhya S. 1933.

The galactose regulon of *Escherichia coli*.

Mol. Microbiol., **10**:245-251. (59)

Weigel N., Kukuruzinska M.A., Nakazawa T., Waygood E.B. and Roseman S. 1982.

Sugar transport by the bacterial phosphotransferase system. Phosphoryl transfert reaction catalysed by enzyme I of *Salmonella typhimurium*.

J. Biol. Chem., **257**:14477-14491. (56)

West I.C. 1970.

Lactose transport coupled to proton movement in *Escherichia coli*.

Biochem. Biophys. Res. Commun., **41**:655-661. (57)

West I.C. and Mitchell P. 1973.

Stoichiometry of lactose-protein symport across the plasma membrane of *Escherichia coli*.

Biochem. J., **132**:587-592. (57)

West I.C. and Mitchell P. 1974.

The proton-ATPase of *Escherichia coli*.

FEBS Lett., **40**:1-4. (117)

White R.J. 1970.

The role of the phosphoenolpyruvate phosphotransferase system in the transport of N-acetyl-D-glucosamine by *Escherichia coli*.

Biochem. J., **118**:89-92. (60)

Williams S.G., Greenwood J.A. and Jones C.W. 1995.

Agrobacterium radiobacter and related organisms take up fructose via a binding protein-dependent active transport.

Microbiol., **141**:2601-2610. (60)

Wilson W.R., Martin W.J., Wilkowske C.J. and Washington J.A. 1972.

Anaerobic bacteremia.

Mayo Clin. Proc., **47**:639-646. (45)

Yamazaki A., Kimamura H., Momose H., Kawashima T. and Katsumoto U. 1982.

Protective effect of *Bifidobacterium*-monoassociation against lethal activity of *Escherichia coli*.

Bifidobacteria Microflora, **1**:55-59. (46)

Yasui H. and Ohwaki M. 1991.

Enhancement of immune response in Peyer's patch cells cultured with *Bifidobacterium breve*.

J. Dairy Sci., **74**:1187-1195. (48)

Yazawa K., Imai K. and Tamura Z. 1978.

Oligosaccharides and polysaccharides specifically utilizable by bifidobacteria.

Chem. Pharm. Bull., **26**:3306-3311. (37)

Ye J-J., Reizer J., Cui X. and Saier M.H. jr. 1994.

Inhibition of the phosphoenolpyruvate:lactose phosphotransferase system and activation of a cytoplasmic sugar-phosphate phosphatase in *Lactococcus lactis* by ATP-dependent metabolite-activated phosphorylation of the serine 46 in the phosphocarrier protein HPr.

J. Biol. Chem., **269**:11837-11844. (57, 65)

Ye J-J. and Saier M.H. jr. 1995.

Allosteric regulation of the glucose:H⁺ symporter of *lactobacillus brevis*: cooperative binding of glucose and HPr(ser-P).

J. Bacteriol., **177**:1900-1902. (58, 109)

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. Tokyo, **74**:1-114. (36)

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**:317-321. (30)

Zani G., Biavati B., Crociani F. and Matteuzzi D. 1974.

Bifidobacteria from the feces of piglets.

J. Appl. Bacteriol., **37**:537-547. (26)



Nous avons étudié la capacité de *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082 à assimiler des saccharides. Cette étude a été réalisée en utilisant la technique de microcalorimétrie. Les résultats obtenus montrent que *Bifidobacterium bifidum* est capable de croître sur milieu riche (TPY) en présence ou en absence de saccharides. Sur milieu semi-synthétique (Garches modifié), seules les N-acétylhexosamines permettent une croissance bactérienne, elles sont donc assimilées comme seule source de carbone. De plus, la quantité de chaleur dégagée est proportionnelle à la consommation du saccharide. Il faut donc à ce niveau réviser les appellations de facteur "bifidogène" qui ne sont en réalité que des nutriments préférentiels des bifidobactéries.

Nous nous sommes intéressés ensuite aux mécanismes d'incorporation de différents saccharides, glucose, fructose, galactose, N-acétylglucosamine, lactose et lacto-N-biose. La détermination du mécanisme de transport de chaque saccharide a été réalisée à l'aide :

- 1) d'inhibiteur de translocation
- 2) de l'étude de la phosphorylation des saccharides

Les six mécanismes de transport se sont avérés être constitutif. Le saccharide utilisé lors de la culture n'entraîne qu'une adaptation de la bactérie au saccharide, voire aucun changement dans la capacité d'incorporation. Les systèmes de transport montrent une grande spécificité vis-à-vis du saccharide qu'ils transportent. Le glucose est véhiculé par un symport à cation régulé par les ions potassium, avant d'être phosphorylé par une glucokinase ATP-indépendante. Le galactose traverserait la membrane par un mécanisme de diffusion. La galactokinase est activée en présence d'ATP. Le lacto-N-biose et le lactose sont incorporés par des symports à proton. La β -D-galactosidase est présente en grande quantité au niveau intracellulaire afin de libérer le glucose et le galactose. Le fructose est aussi véhiculé par un symport à proton. La fructokinase voit son activité diminuer de 60% en présence d'ATP. *Bifidobacterium bifidum* aurait trouvé à ce niveau un moyen de réguler le transport du fructose par un mécanisme de rétro-inhibition. La N-acétylglucosamine serait véhiculée par des protéines membranaires nécessitant une ou plusieurs phosphorylations. La N-acétylhexosamine kinase est ATP-dépendante.

La capacité d'incorporation d'un saccharide est toujours en relation avec son niveau de phosphorylation. Plus le saccharide est incorporé rapidement, plus sa kinase est active.