

**UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE I
UNIVERSITATEA "AL. I. CUZA", IASI**

THESE

présentée par

IULIANA CRISTINA CAESCU

**Pour l'obtention du titre de docteur de l'Université des Sciences et Technologies de
Lille I et de l'Université "Al. I. Cuza", Iasi**

Ecole doctorale: Sciences de la Vie et de la Santé

**Métabolisme saccharidique chez les bifidobactéries.
Approche biomoléculaire des enzymes de phosphorylation.**

Thèse présentée le 16 juillet 2004 devant un jury composé de :

Président: Dr. Ioan Bara, Professeur, Roumanie

**Rapporteurs: Dr. Marieta Costache, Professeur, Roumanie
Dr. Philippe Debeire, Directeur de Recherche, France
Dr. Sophie Foley, Lecturer, Royaume Uni
Dr. Octavian Popescu, Professeur, Roumanie**

**Examineurs: Dr. Dumitru Cojocaru, Professeur, Roumanie
Dr. Jean-Claude Michalski, Directeur de Recherche, France
Dr. Jean Montreuil, Professeur Emerite, France
Dr. Vlad Artenie, Professeur, co-directeur de la thèse, Roumanie
Dr. Stéphane Bouquelet, co-directeur de la thèse, France**

Ce travail a été effectué dans l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle UMR8576 CNRS/USTL, (Directeur Jean-Claude Michalski), dans le cadre d'une thèse en co-tutelle réalisée entre l'Université des Sciences et Technologies de Lille I, France et l'Université « Al. I. Cuza » de Iasi, Roumanie. Nous avons bénéficié d'une Bourse de Formation à la Recherche attribuée par l'Agence Universitaire de la Francophonie (AUF).

Mes premiers remerciements s'adressent à M. le Dr. Jean-Claude Michalski, directeur de l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle UMR 8576 CNRS/USTL. Vous m'avez permis de réaliser ce travail dans les meilleures conditions possibles.

Je voudrais remercier Mesdames et Messieurs les membres du jury d'avoir accepté de juger cette étude, malgré la quantité de travail que cela représente et les difficultés administratives liées à la soutenance d'une thèse en co-tutelle.

Je remercie vivement M. le Pr. Stéphane Bouquet de m'avoir accueillie dans son équipe il y a aujourd'hui cinq ans. Chef, vous avez pris le risque de m'accepter comme jeune étudiante ERASMUS-SOCRATES et de me confier, dix mois plus tard, le premier projet de biologie moléculaire réalisé dans votre laboratoire. J'espère sincèrement que je ne vous ai pas déçu. J'ai appris énormément à votre contact et je vous remercie de m'avoir encouragée à présenter une partie des résultats de mon travail sous la forme de trois communications orales.

À M. le Pr. Vlad Artenie j'adresse mes plus sincères remerciements et ma sympathie. Sa confiance et son dynamisme ont facilité l'aboutissement de cette thèse, le passage des obstacles et la concrétisation des projets. Je tiens à formuler ici le respect que je lui porte ainsi que toute ma reconnaissance.

Je remercie notamment M. le Dr. Olivier Vidal qui m'a fait découvrir les joies et les malheurs de la biologie moléculaire et de la rédaction de différents manuscrits (mémoires de thèse, manuscrit de thèse, article). Olivier, tu as contribué à la définition et à l'évolution de ce travail dès les premiers résultats jusqu'à la rédaction finale. Je te remercie pour ton soutien et pour le partage de ton expérience.

Je tiens particulièrement remercier le Dr. Frédéric Krzewinski qui m'a enseigné les techniques de la biochimie et transmis sans réserve ses connaissances d'informatique. Fred, tu m'as accueillie dans ton foyer aux moments les plus pénibles de cette véritable « aventure lilloise » et m'as apporté ton soutien constant lors des séances de TP effectuées à l'IAAL. Pour tout cela, je t'exprime aujourd'hui tous mes remerciements.

Madame le Dr. Eliane Aïssi m'a constamment apporté son soutien et avec le professionnalisme, l'humour et la patience qui la caractérisent. Je te remercie, Eliane, pour tout cela.

Mes remerciements vont également à Madame Colette Brassart. Sa gentillesse, sa méticulosité et sa bonne humeur m'ont aidé à dépasser les moments difficiles de mon séjour à Lille. Colette, je te remercie beaucoup.

Aline, Emilie, Fadoua, Fanny et Yasmina et moi avons travaillé ensemble durant les deux dernières années de cette thèse. Je vous remercie, Mesdemoiselles, pour votre aide précieuse et pour votre bonne humeur.

J'exprime également toute ma reconnaissance aux membres de l'UMR 8576 pour leur aide et leur sympathie.

Un clin d'œil à mes amie(e)s (Violeta, Dana, Mirela, Tatiana, Laura, Carmen, Loredana, Mickey, Nicky, ...). Je n'oublierai pas nos escapades européennes, votre bonne humeur invariable et l'amitié que vous m'avez toujours témoignée.

J'exprime notamment toute ma reconnaissance à ma famille qui m'a constamment soutenue et encouragée. Sans vous, je n'aurais ni démarré ni aboutit ce projet de thèse à l'étranger. Tous, je vous aime.

Article

***Bifidobacterium longum* Requires a Fructokinase (Frk ; ATP-D-Fructose 6-Phosphotransferase, EC 2. 7. 1. 4) for Fructose Catabolism.** *Journal of Bacteriology*, Vol 186. No19. Oct.2004, p. 6515-6525.

Cristina I. Caescu, Olivier Vidal, Frédéric Krzewinski, Vlad Artenie and Stéphane Bouquelet.

Communications orales

1. Colloque ANAEROBIES 2003, Marseille, 3-4 juin.

Métabolisme des FOS par les bifidobactéries: clonage, expression et caractérisation du gène *ScrK* codant pour une fructokinase chez *Bifidobacterium longum*.

Caescu, C.I., Vidal, O., Krzewinski, F., Aïssi, E., Brassart, C., Artenie, V. et Bouquelet., S.

2. 1st FEMS Congress of European Microbiologists, Slovenia, Ljubljana, June 29 to July 3, 2003

Cloning and Characterization of the *scrK* Gene Encoding a Fructokinase from *Bifidobacterium longum* A10C.

Caescu, C.I., O. Vidal, F. Krzewinski, E. Aïssi, C. Brassart, V. Artenie and S. Bouquelet.

3. 14th Joint Meeting of the « Studiengruppe Glykobiologie der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie », the « Netherlands Society for Glycobiology » and the « Groupe Lillois de Glycobiologie » 20-22 Novembre 2003.

Involvement of a Fructokinase in Fructose and FructoOligoSaccharides' Metabolism of the Probiotic Bacteria *Bifidobacterium longum*. Molecular and Enzymatic Features.

Caescu, C. I., Frédéric Krzewinski, Olivier Vidal, Vlad Artenie et Stéphane Bouquelet.

Sommaire

I. CARACTÉRISATION DU GENRE BIFIDOBACTERIUM	5
<i>I. 1. HISTORIQUE</i>	5
<i>I. 2. MORPHOLOGIE DU GENRE BIFIDOBACTERIUM</i>	6
<i>I. 2. 1. Introduction</i>	6
<i>I. 2. 2. Morphologie</i>	6
<i>I. 2. 3. Hypothèses concernant le pléomorphisme des bifidobactéries</i>	8
<i>I. 2. 3. 1. Hypothèse de l'adaptation</i>	8
<i>I. 2. 4. Conclusion</i>	10
<i>I. 3. STRUCTURE DE LA CELLULE BACTERIENNE</i>	11
<i>I. 3. 1. La paroi cellulaire</i>	11
I. 3. 1. 1. Le peptidoglycane	11
I. 3. 1. 2. Les exopolysaccharides (EPS)	13
<i>I. 3. 1. 2. 1. Généralités</i>	13
<i>I. 3. 2. Le matériel génétique</i>	16
I. 3. 2. 1. Le chromosome bactérien	16
<i>I. 3. 2. 2. 1. 2. REPLICATION PLASMIDIQUE</i>	21
I. 3. 2. 2. Les bactériophages et les prophages	21
<i>I. 4. PHYSIOLOGIE DU GENRE BIFIDOBACTERIUM</i>	23
<i>I. 4. 1. Anaérobiose</i>	23
I. 4. 1. 1. Généralités	23
I. 4. 1. 2. L'anaérobiose et les bifidobactéries	24
<i>I. 4. 2. Température et pH</i>	25
<i>I. 4. 3. Résistance aux antibiotiques</i>	26
<i>I. 4. 4. Effets des sels biliaires</i>	26
<i>I. 5. TAXONOMIE DU GENRE BIFIDOBACTERIUM</i>	27
<i>I. 5. 1. Généralités</i>	27
<i>I. 5. 2. Diagnostique taxonomique</i>	27
I. 5. 2. 1. Le genre <i>Bifidobacterium</i>	27
I. 5. 2. 2. Les espèces du genre <i>Bifidobacterium</i>	31
<i>I. 6. ECOLOGIE DU GENRE BIFIDOBACTERIUM</i>	34
<i>I. 6. 1. Niches écologiques des bifidobactéries</i>	34
<i>I. 6. 2. La flore bifidogène chez l'Homme</i>	34
I. 6. 2. 1. Généralités sur la flore du tractus gastro-intestinal (TGI) humain	34
I. 6. 2. 2. Structure et évolution de la flore bifidogène	38
<i>I. 7. METABOLISME SACCHARIDIQUE DU GENRE BIFIDOBACTERIUM</i>	40
<i>I. 7. 1. Dégradation des chaînes oligosaccharidiques des glycoconjugués</i>	40
I. 7. 1. 1. Fermentation des mucines	40
I. 7. 1. 2. Fermentation des glycosphingolipides	44
<i>I. 7. 2. Fermentation des polysaccharides et des oligosaccharides d'origine végétale</i>	46
I. 7. 2. 1. Arabinofurane hydrolase (EC 3. 2. 1. 55)	47
I. 7. 2. 2. α -L-arabinofuranosidase	47
I. 7. 2. 3. β -D-xylosidase (EC 3. 2. 1. 37)	47
I. 7. 2. 4. α -glucosidases (EC 3. 2. 1. 20)	53
I. 7. 2. 5. β -glucosidases (EC 3. 2. 1. 21)	53
I. 7. 2. 6. α -galactosidases (EC 3.2.1.22)	53
I. 7. 2. 7. β -D-galactosidases (EC 3. 2. 1. 23)	53
I. 7. 2. 8. β -D-fructofuranosidases	54
I. 7. 2. 9. Saccharose-phosphorylase	54
<i>I. 7. 3. Métabolisme des monosaccharides</i>	56
I. 7. 3. 1. Transport membranaire des monosaccharides	56
I. 7. 3. 2. Dégradation des monosaccharides	57
<i>I. 7. 3. 2. 2. La voie de la F6PPK (le "shunt bifide")</i>	58
<i>I. 7. 4. Régulation du métabolisme glucidique. La répression catabolique</i>	61
I. 7. 4. 1. Généralités	61
I. 7. 4. 2. Régulation du métabolisme saccharidique chez <i>Bifidobacterium</i> sp.	65

<u>II. PRINCIPALES CARACTÉRISTIQUES DES FRUCTOKINASES BACTÉRIENNES</u>	66
<i>II. 1. INTRODUCTION</i>	66
<i>II. 2. DÉFINITION</i>	66
<i>II. 3. 1. La famille ROK (Repressors, Open Reading Frames, Kinases)</i>	66
<i>II. 3. 2. La famille PfkB</i>	68
<i>II. 4. INTERACTIONS ENZYME / SUBSTRAT</i>	71
<i>II. 5. COFACTEURS</i>	72
<i>II. 6. MODULATEURS</i>	72
<i>II. 7. PARAMÈTRES FONCTIONNELS</i>	72
<i>II. 7. 1. Le K_M</i>	72
<i>II. 7. 1. 2. Le pH optimum</i>	73
<i>II. 7. 1. 3. L'optimum de température</i>	73
<i>II. 8. LOCALISATION CELLULAIRE</i>	73
<i>II. 9. STRUCTURE ENZYMATIQUE</i>	73
<i>II. 10. PROPRIÉTÉS MOLECULAIRES</i>	76
<i>II. 11. CONCLUSIONS</i>	76
<u>PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS</u>	77
<u>I. INTÉRÊT DE L'ÉTUDE DU MÉTABOLISME DU FRUCTOSE CHEZ LES BIFIDOBACTÉRIES</u>	77
<i>I. 1. LES BIFIDOBACTERIES, BACTERIES PROBIOTIQUES</i>	77
<i>I. 2. LES FRUCTOOLIGOSACCHARIDES, MOLECULES PREBIOTIQUES</i>	77
<u>I. 3. ASPECTS MÉTABOLIQUES DE L'UTILISATION DES FOS PAR LES BIFIDOBACTÉRIES</u>	78
<i>I. 3. 1. Analyse du taux de croissance des bifidobactéries par mesure de la puissance thermique dégagée</i>	78
<i>I. 3. 2. Mise en évidence des enzymes capables d'hydrolyser les FOS</i>	79
<i>I. 3. 3. Métabolisme intracellulaire des FOS chez Bifidobacterium sp.</i>	81
<u>MATÉRIEL ET MÉTHODES</u>	
<u>I. SOUCHES BACTÉRIENNES ET PLASMIDES</u>	83
<u>II. MILIEUX ET CONDITIONS DE CULTURE</u>	83
<i>II. 1. MILIEUX DE CULTURE</i>	83
<i>II. 1. 1. Milieux riches</i>	83
<i>II. 1. 2. Milieu de Garches modifié (Krzewinki et al., 1997)</i>	85
<i>II. 2. CONDITIONS DE CULTURE</i>	85
<i>II. 2. 1. Conditions de culture des souches d'E. coli</i>	85
<i>II. 2. 1. Conditions de culture des souches de Bifidobacterium longum</i>	85
<u>III. ANALYSE PHÉNOTYPIQUE DES SOUCHES DE B. LONGUM</u>	85
<i>IV. 1. PRÉPARATION D'ADN PLASMIDIQUE PAR CHROMATOGRAPHIE D'ÉCHANGE DE CATIONS</i>	86
<i>IV. 2. PRÉPARATION D'ADN CHROMOSOMIQUE DE BIFIDOBACTERIUM LONGUM</i>	86
<i>IV. 2. 1. Lyse bactérienne</i>	86
<i>IV. 2. 2. Extraction et purification de l'ADN génomique</i>	87
<i>IV. 2. 3. Amplification enzymatique d'ADN double brin : méthode PCR (Polymerase Chain Reaction)</i>	87
<i>IV. 2. 3. 1. Principe</i>	87
<i>IV. 2. 3. 2. Mode opératoire</i>	88
<i>IV. 3. DIGESTION, ELECTROPHORESE, ISOLEMENT ET LIGATION DES FRAGMENTS D'ADN</i>	88
<i>IV. 3. 1. Digestion de l'ADN par enzymes de restriction</i>	88
<i>IV. 3. 2. Electrophorèse sur gel d'agarose</i>	89
<i>IV. 3. 3. Isolement d'un fragment d'ADN à partir d'un gel d'agarose</i>	89
<i>IV. 3. 4. Précipitation alcoolique de l'ADN</i>	89
<i>IV. 3. 5. Ligation des brins d'ADN</i>	91
<i>IV. 3. 6. Remplissage de l'extrémité 5' protubérante par l'enzyme de Klenow</i>	91
<i>IV. 4. INTRODUCTION D'ADN DANS UNE BACTERIE</i>	92
<i>IV. 4. 1. Transformation des cellules d'E. coli (Chung et al., 1989)</i>	92
<i>IV. 4. 1. 1. Transformation par choc thermique (kit Invitrogen)</i>	92
<i>IV. 4. 1. 2. Transformation à l'aide du tampon TSS</i>	92

IV. 4. 1. 3. Sélection des clones positifs. L' α complémentation : la β -galactosidase.....	92
IV. 4. 2. Transformation des cellules de <i>Bifidobacterium longum</i> par choc électrique (électroporation) (Rossi et al., 1992).....	93
IV. 4. 2. 1. Principe.....	93
IV. 4. 2. 2. Préparation des cellules compétentes de <i>Bifidobacterium longum</i>	93
IV. 4. 2. 3. Transformation des cellules compétentes de <i>B. longum</i> par électroporation.....	93
IV. 5. TECHNIQUES D'HYBRIDATION MOLECULAIRE. TRANSFERT D'ADN SUR MEMBRANE DE NYLON (SOUTHERN BLOT).....	94
IV. 5. 1. Principe.....	94
IV. 5. 2. Mode opératoire.....	94
IV. 5. 2. 1. Préparation de l'ADN.....	94
IV. 5. 2. 3. Préparation de la sonde pour hybridation.....	94
IV. 5. 2. 4. Hybridation ADN-ADN avec la sonde marquée.....	95
IV. 5. 2. 5. Détection de la sonde marquée par la digoxygénine par chimioluminescence (DNA-Labeling and Detection kit, Roche).....	95
IV. 5. 2. 5. 1. Principe.....	95
IV. 5. 2. 5. 2. Mode opératoire.....	95
IV. 6. SEQUENÇAGE DE L'ADN.....	96
<u>V. MÉTHODES BIOCHIMIQUES</u>	96
V. 1. CARACTERISATION DU PRODUIT D'UN GENE PAR LE SYSTEME T7 ARN POLYMERASE.....	96
V. 1. 1. Principe.....	96
V. 1. 2. Mode opératoire.....	97
V. 1. 2. 1. Obtention du plasmide d'expression pFrK2.....	97
V. 1. 2. 2. Expression et purification de la protéine recombinante.....	98
V. 1. 2. 3. Séparation électrophorétique des protéines sur gel de polyacrylamide-SDS (SDS-PAGE).....	99
V. 1. 2. 3. 4. Dépôt des échantillons et migration des protéines dans le gel.....	100
V. 1. 2. 3. 5. Coloration et décoloration du gel.....	100
V. 1. 2. 4. Mesure de l'activité fructokinase de la protéine FrK.....	100
V. 5. ANALYSE DES PARAMETRES BIOCHIMIQUES DE LA PROTEINE FRK.....	103
V. 5. 1. Détermination de la concentration en enzyme.....	103
V. 5. 2. Détermination du pH optimal et de la température optimale.....	103
V. 5. 3. Analyse de la spécificité de substrat.....	103
V. 5. 4. Paramètres cinétiques.....	104
V. 5. 5. Détermination de la température de dénaturation.....	104
V. 6. DETERMINATION DU TAUX D'INCORPORATION DU FRUCTOSE PAR <i>B. LONGUM</i>	104
V. 7. DETERMINATION DU TAUX D'UTILISATION DU FRUCTOSE PAR <i>B. LONGUM</i>	105
<u>V. MÉTHODES DE BIOINFORMATIQUE</u>	105
<u>RÉSULTATS ET DISCUSSIONS</u>	
<u>CHAPITRE I. UTILISATION DU FRUCTOSE PAR <i>B. LONGUM</i></u>	106
I. 1. ETUDE DE LA CAPACITE DE DIFFERENTES SOUCHES DE <i>B. LONGUM</i> A CROITRE EN PRESENCE DE FRUCTOSE COMME SEULE SOURCE DE CARBONE.....	106
I. 1. 1. Introduction.....	106
I. 1. 2. Etude phénotypique de 15 souches de <i>B. longum</i>	106
I. 1. 3. Discussion.....	108
I. 2. ETUDE COMPARATIVE DE L'UTILISATION DU FRUCTOSE ET DU GLUCOSE PAR <i>B. LONGUM</i> A10C.....	109
I. 2. 1. Principe.....	109
I. 2. 2. Etude de la consommation du fructose et du glucose par <i>B. longum</i> A10C.....	109
I. 2. 3. Voie de fermentation du glucose et du fructose par <i>B. longum</i>	112
I. 2. 3. 1. Identification de la voie de fermentation du fructose chez <i>B. longum</i> A10C.....	112
I. 2. 3. 2. Analyse du profil de fermentation du fructose et du glucose par <i>B. longum</i> DSM20219.....	114
I. 2. 3. 3. Enzymes potentiellement responsables de la phosphorylation du fructose chez <i>B. longum</i>	114
<u>CHAPITRE II. CLONAGE DU GÈNE FRK CODANT POUR UNE FRUCTOKINASE DE <i>B. LONGUM</i> A10C</u>	118
II. 1. LOCALISATION GENOMIQUE ET ANALYSE DU CONTEXTE GENETIQUE DU GENE FRK.....	118
II. 1. 1. Généralités.....	118
II. 1. 2. Localisation chromosomique du gène codant pour la fructokinase de <i>B. longum</i> A10C.....	119
II. 1. 2. 1. Clonage par complémentation de l'opéron saccharose de <i>B. longum</i> A10C.....	119
II. 1. 2. 2 Clonage par homologie de séquence avec d'autres fructokinase caractérisées.....	121

II. 1. 2. 3. Analyse de la séquence chromosomique annotée de deux souches de <i>B. longum</i> (DJ010A et NCC2705).....	123
<u>II. 2. CLONAGE, SÉQUENÇAGE DU GÈNE <i>frK</i> DE <i>B. LONGUM</i> A10C ET ANALYSE DE SÉQUENCE</u>	126
II. 2. 1. Définition des amorces nucléotidiques spécifiques de la séquence de 894 pb.....	126
II. 2. 2. Clonage du cadre de lecture du gène <i>frK</i>	129
II. 2. 2. 1. Amplification du cadre de lecture du gène <i>frK</i>	129
II. 2. 2. 2. Analyse de séquence.....	129
<u>II. 3. TEST D'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DE LA PROTÉINE <i>FrK</i> PRODUITE EN SYSTÈME HÉTÉROLOGUE CHEZ <i>E. COLI</i> (<i>FRU</i>)</u>	133
<u>CHAPITRE III. PURIFICATION ET CARACTÉRISATION DES PARAMÈTRES ENZYMATIQUES DE LA PROTÉINE <i>FrK</i> DE <i>B. LONGUM</i> A10C</u>	135
III. 1. GÉNÉRALITÉS.....	135
III. 2. CLONAGE DE L'AMPLICON DE 894 PB DANS LE VECTEUR D'EXPRESSION <i>PET28</i>	135
III. 3. INDUCTION DE LA SYNTHÈSE DE L'ARN T7 POLYMERASE PAR L' <i>lptG</i>	135
III. 4. PURIFICATION DE LA PROTÉINE <i>FrK</i> PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ.....	136
III. 5. ÉTUDE BIOCHIMIQUE D'UNE FRUCTOKINASE DE <i>B. LONGUM</i> A10C.....	136
III. 5. 1. Gamme étalon et choix de l'unité de concentration.....	136
III. 5. 2. Influence de la quantité de protéine sur l'activité enzymatique.....	136
III. 5. 3. Influence du temps d'incubation sur l'activité enzymatique.....	141
III. 5. 4. Influence du pH sur l'activité enzymatique. Optimum de pH.....	141
III. 5. 5. Influence de la température sur la réaction enzymatique. Optimum de température.....	141
III. 5. 6. Etude de la stabilité enzymatique à différentes températures.....	141
III. 5. 7. Discussion.....	145
III. 5. 8. Détermination des paramètres cinétiques K_M et V_M	148
III. 5. 8. 1. Résultats.....	148
III. 5. 8. 2. Discussion.....	148
III. 5. 9. Spécificité de substrat.....	151
III. 5. 9. 1. Spécificité de la fructokinase pour le substrat saccharidique (accepteur).....	151
III. 5. 9. 2. Spécificité de la fructokinase pour le substrat donneur (le nucléotide triphosphate).....	154
<u>CHAPITRE IV. ÉTUDE DE L'EXPRESSION DU GÈNE <i>frK</i> DE <i>B. LONGUM</i> A10C EN FONCTION DE LA SOURCE DE CARBONE PRÉSENTE DANS LE MILIEU DE CULTURE</u>	159
IV. 1. GÉNÉRALITÉS.....	159
IV. 2. ANALYSE DE L'ACTIVITÉ FRUCTOKINASE DES CELLULES CULTIVÉES EN PRÉSENCE DE GLUCOSE COMME SEULE SOURCE DE CARBONE.....	159
IV. 3. ANALYSE DE L'ACTIVITÉ FRUCTOKINASE DES CELLULES CULTIVÉES EN PRÉSENCE DE FRUCTOSE COMME SEULE SOURCE DE CARBONE.....	162
IV. 4. ANALYSE DE L'ACTIVITÉ FRUCTOKINASE DES CELLULES CULTIVÉES EN PRÉSENCE D'UNE SOURCE DE CARBONE CONSTITUÉE D'UN MÉLANGE ÉQUIMOLÉCULAIRE DE GLUCOSE ET FRUCTOSE.....	162
IV. 5. DISCUSSIONS.....	162
IV. 5. 1. Induction de l'expression du gène <i>frK</i> par le D-fructose.....	162
<u>CHAPITRE V. CARACTÉRISATION DU PHÉNOTYPE <i>FRU</i> DE LA SOUCHE</u>	165
<u>B. LONGUM DSM20219</u>	165
V. 1. TRANSPORT TRANSMEMBRANAIRE DU FRUCTOSE.....	165
V. 2. ÉTUDE DU CONTEXTE GÉNÉTIQUE DU LOCUS <i>frK</i> CHEZ <i>B. LONGUM</i> DSM20219.....	167
V. 2. 1. Analyse par PCR du locus <i>frK</i>	167
V. 2. 1. 1. Absence de la séquence codante de la protéine <i>FrK</i>	167
V. 2. 1. 2. Analyse par PCR du contexte génétique du locus <i>frK</i>	167
V. 2. 1. 3. Analyse d'un fragment chromosomique situé 2,5 kb en amont du locus <i>glK</i>	171
V. 2. 1. 4. Analyse d'un fragment chromosomique situé 2,5 kb en aval du locus <i>frK</i>	174
V. 2. 2. Analyse génotypique de <i>B. longum</i> DSM20219 par technique d'hybridation (ADN-ADN) sur membrane.....	177
V. 2. 2. 1. Choix et analyse des sondes oligonucléotidiques.....	177
V. 2. 2. 2. Etude de la délétion par analyse du profil de restriction de trois endonucléases.....	180
V. 2. COMPLÉMENTATION <i>IN VITRO</i> DE LA SOUCHE MUTANTE <i>B. LONGUM</i> DSM20219 (<i>FRK</i>).....	181
Conclusions générales.....	183
Bibliographie.....	185

ADN	acide désoxyribonucléique
ADNg	acide désoxyribonucléique génomique
ATP	adénosine triphosphate
BET	bromure d'ethidium
CTP	citidine triphosphate
DMSO	diméthyl sulfoxyde
DO	densité optique
EDTA	ethylene diamino-tétra-acétate
F (Fru)	fructose
F-1,6-P	fructose-1,6-diphosphate
F6P	fructose-6-phosphate
Glc	glucose
G6P(Glc6P)	glucose-6-phosphate
GTP	guanosine triphosphate
IPTG	isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside
ITP	inosine triphosphate
Kb	kilobase (10^3 pb)
kDa	kiloDalton (10^3 Da)
Mb	mégabase (10^6 pb)
NAD(P) ⁺	nicotine amide adenine dinucléotide (phosphate), forme oxydée
NAD(P)H	nicotine amide adenine dinucléotide (phosphate), forme réduite
ND	non déterminé(e)
ORF	« <u>o</u> pen <u>r</u> eading <u>f</u> rame », cadre ouvert de lecture
pb	paire de bases
PBS	« <u>p</u> hosphate <u>b</u> uffer <u>s</u> aline »
PCR	« <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction »
RT-PCR	« <u>r</u> everse- <u>t</u> ranscriptase <u>P</u> CR »
SDS-PAGE	« <u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate- <u>p</u> oly <u>a</u> crylamide gel <u>e</u> lectrophoresis »
S7P	sédoheptulose-7-phosphate
SSC	« <u>s</u> aline <u>s</u> odium <u>c</u> itrate buffer »
TBE	<u>T</u> ris- <u>B</u> orate- <u>E</u> DTA
TRIS	Tri(hydroxyméthyl)aminométhane
TTP	Timidine triphosphate
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D- <u>g</u> alactoside

Généralités

I. Caractérisation du genre *Bifidobacterium*

Les microorganismes du genre *Bifidobacterium* sont des bactéries à Gram positif à haut pourcentage en Guanine et Cytidine (GC), anaérobies strictes, immobiles, non-sporulantes, de formes très irrégulières et présentant souvent des branchements ou des extrémités bifides. Selon Buchanan et Gibbons (1974), ces microorganismes possèdent une voie spécifique du métabolisme des hexoses, ne présentent pas d'activité catalase et ne dégradent pas les structures à noyau indole et les nitrates (*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Buchanan et Gibbons, 8th ed., 1974). Commensaux de l'intestin humain et animal, les bifidobactéries sont souvent associées avec un état de santé et de bien être pour l'individu (Gorbach *et al.*, 1967, Mata *et al.*, 1969; Drasar et Hill, 1974; Savage, 1977; Fuller, 1989), ce qui a conduit à leur utilisation dans les industries agro-alimentaires.

Dans ce chapitre nous allons synthétiser les principales caractéristiques biologiques, biochimiques et génétiques du genre *Bifidobacterium*.

I. 1. Historique

Les bifidobactéries ont été isolées pour la première fois il y a un peu plus d'un siècle par Tissier, à l'Institut Pasteur de Paris, à partir de fèces de nourrisson (Tissier, 1900). Tissier a été le premier à suggérer qu'il existerait une corrélation entre la dominance numérique des bifidobactéries (illustration de la composition de la flore fécale cultivable), les particularités nutritionnelles et l'état de santé des enfants (Tissier, 1906).

Classées d'abord pour des raisons morphologiques dans le genre *Bacillus*, puis *Lactobacillus* à cause de la production d'acide lactique lors de la fermentation des saccharides (Weiss et Rettger, 1934), les bifidobactéries se voient attribuées un genre homonyme soixante-quinze ans après leur découverte. Ainsi, le terme générique de *Bifidobacterium*, proposé pour la première fois en 1924, par Orla Jensen (Orla-Jensen, 1924) est confirmé en 1974 dans la huitième édition de *Bergey's Manual* (Buchanan et Gibbons, 1974).

Les premières études menées sur les bifidobactéries portent sur leur isolement et leur identification (mise au point de milieux de culture riches et minimum, Blaurok, 1937, Norris *et al.*, 1950, Hassinen *et al.*, 1951), puis sur la caractérisation de leur morphologie (pléomorphisme bactérien- Glick *et al.*, 1960; Kojima *et al.*, 1970; Husain *et al.*, 1972 et structure de la paroi cellulaire- Cummins *et al.*, 1957; Exterkate et Veerkamp, 1969; Kandler, 1970). Par la suite, ces travaux ont permis de caractériser leur physiologie (anaérobiose- De Vries et Stouthamer, 1969) et leur métabolisme saccharidique (Scardovi et Trovatelli, 1965; De Vries *et al.*, 1967). Lors de l'étude de l'écologie des bifidobactéries, différents auteurs ont suggéré un rôle bénéfique de ces microorganismes sur l'hôte (effet probiotique) (Hoffmann, 1966; Coates et Fuller, 1977 ; Fuller, 1989).

Malgré l'avènement de l'ère moléculaire depuis 1990, peu de gènes de *Bifidobacterium* ont été caractérisés. Depuis 2003, les séquences nucléotidiques du chromosome de deux souches de *Bifidobacterium longum*, DJ010A et NCC2705, hôtes de

l'intestin humain sont accessibles sur le réseau informatique (NZ_AABF00000000 et NC_004307, respectivement).

I. 2. Morphologie du genre Bifidobacterium

I. 2. 1. Introduction

Les bifidobactéries sont des bactéries à Gram positif à haut pourcentage en GC appartenant à la classe des *Actinobacteria*. Cette classe est composée de deux ordres: les *Actinomycetales* (qui inclut les genres *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Streptomyces* etc) et les *Bifidobacteriales* (Euzeby et Tindall, 2001). Au niveau morphologique, cette parenté est visible surtout lors de la formation par les bifidobactéries de complexes multicellulaires de type mycellaire, capables d'autodivision.

I. 2. 2. Morphologie

Observées au microscope électronique, les bifidobactéries apparaissent comme des cellules de forme bacillaire ou coccoïde (Figure G1, page 3). Parfois, mêmes des systèmes multicellulaires de type mycélium ont été décrits.

En 1935, Eggerth décrit pour la première fois trois types morphologiques différents de bifidobactéries isolées à partir de fèces de nourrissons. Il observe des cellules de forme bifide, telles que celles décrites par Tissier en 1900. Ces cellules conduisent en 6 jours à des cellules présentant 6 à 8 branches latérales (forme dite de type mycélium). Il décrit également de longues chaînes de cellules de bifidobactéries de forme coccoïde.

I. 2. 2. 1. Le type bacillaire

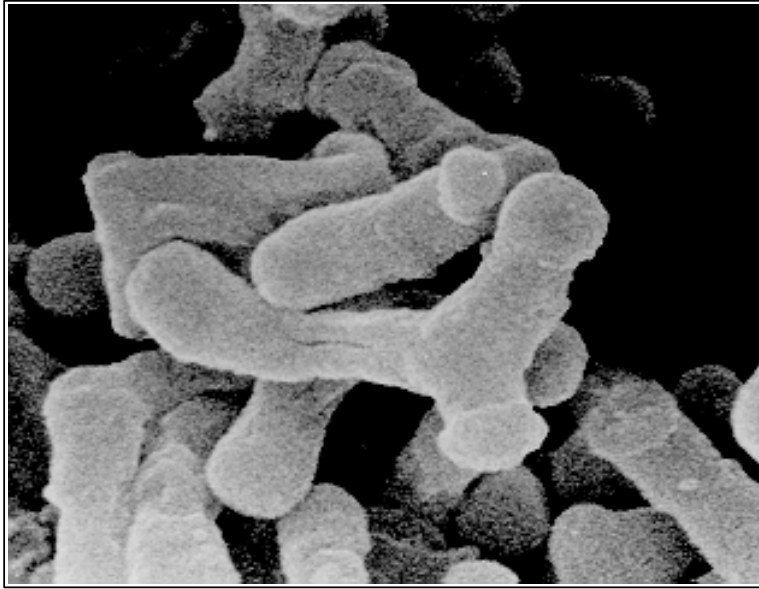
Selon Novik et collaborateurs (1996), les formes bacillaires, régulières ou incurvées aux contours irréguliers peuvent présenter des extrémités effilées, bifurquées ou spatulées.

I. 2. 2. 2. Le type coccoïde

Eggerth (1935) et Norris (1950) observent au microscope optique des cellules de *B. bifidum* de forme coccoïde, sphériques ou irrégulières, parfois enchaînées.

En 1996, Novik et Vysotskii observent au microscope électronique deux espèces de *Bifidobacterium* : *B. adolescentis* et *B. bifidum*. Dans les deux cas ils décrivent deux types cellulaires coccoïdes se distinguant par l'épaisseur de la paroi cellulaire:

- des coques pour lesquels l'épaisseur de la paroi cellulaire est comparable avec celle de la paroi de la cellule mère (appelés coques de type I);
- des cellules coccoïdes caractérisées par une paroi cellulaire très épaisse (70 nm) et par des accumulations intracytoplasmiques de polyphosphate et de glycérol (coques de type II).



X 28000

Figure G1. Observation en microscopie électronique de balayage des cellules de *Bifidobacterium bifidum* 20082 (forme bifide). (Dr. E. Aïssi, résultat non publié).

I. 2. 2. 3. Le type mycélium

La présence de structures de type mycélium pour des cultures de *Bifidobacterium* sp. a été moins souvent décrite dans la littérature. Par exemple, des complexes multicellulaires très ramifiés, présents dans une culture de *B. bifidum* sont décrits par Negroni et Fischer (1944). Ils comparent la structure de *B. bifidum* avec *Actinomyces bovis* et constatent un degré de polymorphisme plus élevé dans la culture de *Bifidobacterium bifidum* par rapport à celle d'*Actinomyces*. Leur conclusion est que les deux organismes sont morphologiquement similaires, mais non identiques. Plus tard, Frank et Skinner (1954) confirment les ressemblances morphologiques entre les deux genres et remarquent que les formes bacillaires ramifiées apparaissent moins souvent chez *Actinomyces bovis* par rapport au *Bifidobacterium bifidum*.

I. 2. 3. Hypothèses concernant le pléomorphisme des bifidobactéries

Ce phénomène pléomorphique rare sinon unique dans le monde des microorganismes n'a pas encore été élucidé. Selon les deux hypothèses actuellement véhiculées, il s'agirait soit d'une modification morphologique réversible des cellules de *Bifidobacterium* sp. en réponse aux déficiences nutritionnelles du milieu de culture (hypothèse de l'adaptation) soit d'un processus irréversible, génétiquement contrôlé (hypothèse du déterminisme).

I. 2. 3. 1. Hypothèse de l'adaptation

Glick et collaborateurs sont les premiers à s'intéresser aux facteurs induisant l'apparition de formes non conventionnelles dans une culture de *B. bifidum* var *pennsylvanicus* (Glick *et al.*, 1960). Ils attribuent ce phénomène à une déficience en N-acétylhexosamines (N-acétylglucosamine et N-acétylgalactosamine) qui seraient indispensables pour la synthèse de la paroi cellulaire. En effet, lorsque cette souche est cultivée dans divers milieux de culture ne différant que par la quantité de N-acétylhexosamines qu'ils renferment, trois types morphologiques sont observés. Des formes bacillaires très ramifiées sont présentes en absence de N-acétylhexosamines. Des formes bifurquées sont observées pour des concentrations "intermédiaires" en N-acétylhexosamines. Enfin, des formes bacillaires classiques apparaissent lorsque le milieu de culture renferme des quantités importantes de N-acétylhexosamines. O'Brien et Lambert démontrent, à l'aide de N-acétylhexosamines radiomarquées l'incorporation de ces substrats glucidiques dans le peptidoglycane (O'Brien *et al.*, 1960, Lambert *et al.*, 1965).

Ces auteurs concluent qu'une déficience du milieu de culture en hexoses N-acétylés influence le processus de synthèse de la paroi cellulaire et serait la cause du pléomorphisme des bifidobactéries.

Par ailleurs, Kojima et ses collaborateurs observent l'importance des sels de sodium, des chlorures de cations monovalents et du chlorure de calcium (CaCl_2) dans l'apparition des formes bifides (Kojima *et al.*, 1968; 1970). Ces auteurs interprètent ces observations de la manière suivante.

Selon une première hypothèse, ce pléomorphisme serait dû aux variations de pression osmotique induites dans le milieu de culture par les variations de concentration saline.

L'ajout de différentes quantités de polyéthylène glycol et de rhamnose destinées à modifier l'osmolarité du milieu n'empêche pas l'apparition des formes bifides.

Une deuxième explication prend en compte l'influence du chlorure de sodium (NaCl) sur la division cellulaire et la formation de la paroi cellulaire. Ces auteurs ont constaté qu'un milieu riche en NaCl entraîne une augmentation de la masse cellulaire (25 fois par rapport à une culture "standard"), une légère accélération de la division cellulaire (1,5 fois par rapport à la culture témoin) et une augmentation du pléomorphisme. Toutefois, aucune explication concernant le mode d'action du NaCl n'est proposée.

Troisièmement, ces auteurs s'intéressent au rôle du CaCl_2 vis-à-vis de ce phénomène pléomorphique. D'une part ils constatent que le taux de calcium présent dans les cellules entières ainsi que dans la paroi cellulaire des formes bacilles classiques est supérieur aux cellules de forme bifide. D'autre part, ils observent l'apparition des formes bifides lorsque dans le milieu sont rajoutés des agents chélateurs du calcium, tels que l'EDTA. En 1970 ces mêmes auteurs démontrent l'implication du Ca^{2+} dans la formation des septa et concluent que les ions calcium sont indispensables au processus de cytokinèse des bifidobactéries (Kojima *et al.*, 1970).

En 1972 Husain et collaborateurs cultivent en milieu minimum une souche de *B. bifidum* var *pennsylvanicus* qui présente initialement une morphologie bacillaire classique (Husain *et al.*, 1972). Les bactéries issues de cette culture présentent, par contre, des branchements multiples. L'ajout dans le milieu de culture de quatre acides aminés (l'alanine, l'acide aspartique, l'acide glutamique et la sérine) permet de rétablir la morphologie bacillaire initiale. Ces quatre acides aminés sont normalement présents dans la paroi cellulaire de *B. bifidum* var. *pennsylvanicus* (Cummins *et al.*, 1957; Veerkamp *et al.*, 1965). Ainsi, les auteurs considèrent qu'une même souche peut être gardée indéfiniment dans un des types morphologiques souhaités (bacille ou ramifié) suivant la présence ou non de ces quatre acides aminés.

Poupard et collaborateurs ont isolé des bifidobactéries (formes bacillaires classiques et bifides) à partir de fèces d'enfant et les ont cultivés pendant 22 ans dans un milieu riche (milieu de Norris) (Poupard *et al.*, 1973). Dans ces conditions nulle modification morphologique n'a été constatée. Par contre, si ces bactéries servent à inoculer d'autres milieux de cultures tels que tomate-casein peptone-yeast agar ou thioglycolate, on constate l'apparition des formes dites "bizarres", avec de multiples branchements. Ces auteurs concluent que l'apparition de ces types morphologiques inhabituels n'est pas nécessairement une forme d'involution ou de dégénérescence de l'organisme bactérien, mais serait plutôt une réaction d'adaptation à un environnement moins favorable du point de vue nutritionnel.

I. 2. 3. 2. Hypothèse du déterminisme

Cette seconde hypothèse est soutenue par les observations de microscopie électronique de Novik et de ses collaborateurs (Novik *et al.*, 1996). Selon ces auteurs, au cours du cycle cellulaire aurait lieu une transformation séquentielle des cellules bacillaires

et coccoïdes (appelées formes "transitoires") vers des formes filamenteuses multiseptées et ramifiées. Ces complexes multicellulaires produiraient, par fragmentation, des cellules coccoïdes capables de réplication. Ces résultats ont été fournis par des observations menées sur deux espèces de bifidobactéries: *Bifidobacterium bifidum* et *Bifidobacterium adolescentis* cultivées dans le milieu de Blaurok (Blaurok *et al.*, 1937) et sont à corrélérer avec les modifications subies par la paroi cellulaire pendant la division bactérienne.

Ainsi, en phase exponentielle de croissance, des cellules de forme coccoïde et bacillaire sont présentes dans le milieu de culture. Ces cellules se multiplient par division binaire. Une invagination de la membrane cytoplasmique des cellules bacillaires permet l'apparition d'un septum transversal ou polaire, conduisant respectivement à deux cellules filles de forme bacillaire ou un coque et un bacille. La division des cellules coccoïdes se réalise par une invagination centripète de la membrane plasmique et conduit à deux coques (Novik *et al.*, 1996).

A la fin de la phase exponentielle de croissance et tout au long de la phase stationnaire les cellules présentent une tendance prononcée à septation multiple et ramification, conduisant aux complexes multicellulaires. Ainsi, selon Novik (1996), dans une même population de bifidobactéries on pourrait avoir en même temps une division binaire et une division par bourgeonnement.

Les informations de Novik sont en accord avec la théorie de Gyllenberg (Gyllenberg, 1955). Selon ces deux auteurs, les deux types coccoïde et bacillaire classique constituent l'étape initiale du cycle de développement cellulaire des bifidobactéries. Ces deux types morphologiques "transitoires" évolueraient vers des formes pluricellulaires complexes présentant de multiples ramifications latérales, parfois inégales ou irrégulières. Ces phénomènes de bourgeonnement et de ramification multiple constitueraient un processus génétiquement déterminé qui permet l'accumulation d'un maximum de biomasse dans un volume constant de milieu de culture (ou dans un environnement limité). Cependant, Novik associe également ce phénomène morphologique à une diminution de la concentration en nutriments, accompagnée d'une accumulation de métabolites toxiques et d'une augmentation de la masse cellulaire (Novik *et al.*, 1996).

I. 2. 4. Conclusion

Il apparaît donc que la variété morphologique rencontrée chez les bifidobactéries soit un phénomène nuancé influencé par les conditions de culture et régulé par des mécanismes génétiques complexes, encore imparfaitement élucidés.

I. 3. Structure de la cellule bactérienne

I. 3. 1. La paroi cellulaire

Les bifidobactéries sont des bactéries à Gram positif. Donc, d'un point de vue structural, leur paroi cellulaire est composée d'une seule membrane plasmique entourée d'une couche épaisse de peptidoglycane. A ces structures se rattachent des chaînes d'exopolysaccharides et des acides téichoïques.

I .3. 1. 1. Le peptidoglycane

Dans "Microbial Cell Walls and Membranes" Rogers et ses collaborateurs décrivent le peptidoglycane des bactéries à Gram positif comme une macromolécule géante, de 20 à 80 nm épaisseur, formée exclusivement par des liaisons covalentes, impliquée dans le maintien de la forme et de l'intégrité, dans la division et dans l'adhérence cellulaire (Rogers *et al.*, 1980). Selon ces auteurs, le peptidoglycane est une structure composée de plusieurs couches de nature glucidique reliées par de nombreuses chaînes peptidiques. Dans la plus grande majorité des bactéries à Gram positif, la partie glucidique est composée de plusieurs unités monomères constituées de N-acétylglucosamine associée à l'acide N-acétyl muramique par une liaison β -1,4-glycosidique. Exception faite des genres *Mycobacterium* et *Nocardia* où le résidu de l'acide N-acétyl muramique est remplacé par un résidu d'acide N-glycolyl neuraminique.

Le tétrapeptide est constitué principalement par des séquences de quatre résidus d'acides aminés liés par leur partie N-terminale au résidu carboxyle de l'acide muramique. Ces chaînes peptidiques ont une structure primaire identique chez plusieurs genres bactériens. Lors de l'analyse de ces structures peptidiques chez *Bifidobacterium* sp., ainsi que chez *Lactobacillus* sp. et *Streptococcus* sp. , Cummins et Kandler ont montré qu'il existe un tétrapeptide présent chez tous les trois genres bactériens étudiés, dont la structure est la suivante (Cummins, *et al.*, 1957; Kandler, 1970 ; Holzapfel *et al.*, 1969; Koch *et al.*, 1970):



Dans leur revue bibliographique, Poupard et ses collaborateurs considèrent que ce tétrapeptide représente une constante structurale du peptidoglycane des bifidobactéries, mais il n'est pas spécifique du genre *Bifidobacterium* (Poupard *et al.*, 1973).

Comme chez toutes les espèces de bactéries à paroi à Gram positif, des chaînes peptidiques constantes sont connectées entre elles par des ponts oligopeptidiques constitués de un à quatre résidus d'acides aminés.

De même que pour les chaînes constantes, la structure des chaînes variables n'est pas spécifique de l'espèce. En effet, Kandler et Lauer ont déterminé la structure de ces chaînes dites "variables" (Tableau G1, page 8) (Kandler et Lauer, 1974). Pour huit espèces de *Bifidobacterium* la connexion entre les deux types de chaînes s'effectue par un seul acide aminé. Cet acide aminé est le glycolle (chez *B. longum* biovar *infantis*, *B. breve*, *B. liberorum*, *B. parvulorum*, *B. asteroides*), l'acide glutamique (chez *B. thermophilum*) ou l'acide aspartique (chez *B. adolescentis* et *B. indicum*). Chez *B. pseudolongum* cette structure charnière est constituée de deux à trois résidus de L-alanine. *B. longum* biovar *longum* et *B. longum* biovar *suis* seraient les seuls à posséder une séquence variable formée de quatre résidus d'acides aminés (Ser -Ala- Thr- Ala).

De même que pour les séquences constantes, ces séquences variables se retrouvent aussi chez d'autres genres bactériens. En effet, des ponts constitués d'un seul résidu d'acide aspartique ont été mis en évidence chez *Enterococcus faecium* (Billot-Klein *et al.*, 1996; de Jonge *et al.*, 1996). De même, un dipeptide de type alanyl-alanine a été mis en évidence chez *Enterococcus faecalis* et chez *Pneumococcus* sp. (Mainardi *et al.*, 1998; Severin et Tomasz, 1996).

Tableau G1. Caractéristiques structurales de la paroi cellulaire de douze espèces de *Bifidobacterium*. Les acides aminés en gras font partie du tetrapeptide de structure constante du peptidoglycane et fournissent les résidus NH₂ nécessaires à la fixation de la séquence peptidique variable.

Espèces	Niche écologique	Structure primaire de la séquence variable	Monosaccharides détectés	Référence
<i>B. infantis</i>	enfant	Lys-Gly	Gal, Glc, Rha	Kandler et Lauer, 1974
<i>B. breve</i>	enfant	Lys-Gly	Gal, Glc, Rha	Kandler et Lauer, 1974
<i>B. liberorum</i>	enfant	Lys-Gly	Gal, Glc, Rha	Kandler et Lauer, 1974
<i>B. parvulorum</i>	enfant	Lys-Gly	Gal, Glc, Rha	Kandler et Lauer, 1974
<i>B. asteroides</i>	abeille	Lys-Gly	Gal, Glc	Kandler et Lauer, 1974
<i>B. thermophilum</i>	porc	Orn (Lys)- Glu	Gal, Glc, Rha	Kandler et Lauer, 1974
<i>B. adolescentis</i>	adulte	Lys (Orn)- Asp	Glc, 6-déoxytalose, Gal	Nagaoka, 1996; Nagaoka <i>et al.</i> , 1998; Kandler et Lauer, 1974
<i>B. indicum</i>	abeille	Lys - Asp	Gal, Rha	Kandler et Lauer, 1974
<i>B. pseudolongum</i>	porc	Orn (Lys)- Ala	Gal, Glc, Rha	Kandler et Lauer, 1974
<i>B. bifidum</i>	adulte	Orn-Ser-Asp	Gal, Glc, Rha, Mannitol, Xylose, 6-déoxy- Talose	Vogel, 1952; Veerkamp, 1983; Wang 1969; Kandler et Lauer, 1974
<i>B. suis</i>	porc	Orn (Lys)-Ser-Ala-Thr-Ala	Gal, Glc, Rha	Kandler et Lauer, 1974
<i>B. longum</i>	adulte	Orn (Lys)-Ser-Ala-Thr-Ala	Gal, Glc, Rha	Kandler et Lauer, 1974; Nagaoka <i>et al.</i> , 1995

I. 3. 1. 2. Les exopolysaccharides (EPS)

I. 3. 1. 2. 1. Généralités

Les exopolysaccharides bactériens sont des homo- ou hétéropolysaccharides extracellulaires, attachés à la cellule bactérienne (constituants de la capsule) ou libres dans le milieu de culture (sous la forme d'un mucus) (Sutherland, 1972).

Lors de cultures successives de *B. bifidum* isolé à partir de fèces d'enfant Malyoth et Bauer (1950) et plus tard Norris et collaborateurs (1954) constatent l'apparition de colonies d'aspect mucoïde parmi les colonies lisses. Les deux types morphologiques ne manifestent pas d'exigences nutritionnelles différentes et nulle conversion du phénotype "mucoïde" vers le phénotype lisse n'a été constatée.

I. 3. 1. 2. 2. Structure

Différentes structures polysaccharidiques produites par le genre *Bifidobacterium* sont décrites dans la littérature, sans que les auteurs précisent toujours s'il s'agit d'un exopolysaccharide (Tableau G2, page 10).

En 1952 Vogel attribue cette caractéristique morphologique à l'existence d'une capsule polysaccharidique dont il détermine la structure chimique. L'analyse de cet EPS par chromatographie sur papier montre la présence de glucose, de xylose, d'acide uronique, ainsi que d'un pentose non identifié et d'un hexose qui migre comme un saccharide méthylé.

En 1963, Wang et collaborateurs analysent la composition chimique d'un autre polysaccharide excrété par une souche mucoïde non encapsulée de *B. bifidum* (souche Jackson M). Cet exopolysaccharide appelé "Bifidan" est composé de D-glucose, de D-galactose, de 6- déoxytalose et d'acide D- galacturonique.

La structure de différentes séquences polysaccharidiques isolées à partir de la paroi cellulaire de différentes espèces de *Bifidobacterium* est présentée dans le Tableau G2. Le mode d'ancrage de ces structures à la paroi cellulaire reste, dans la grande majorité des cas, à élucider.

Veerkamp d'une part et Fischer, Iwasaka et Op den Camp d'autre part, ont essayé d'identifier les monomères constituant le polysaccharide produit par *B. bifidum* biovar. *pennsylvanicus*. En 1983, Veerkamp isole à partir de la paroi cellulaire de cette souche un hétéropolysaccharide composé de rhamnose et de glucose, qui serait directement lié au peptidoglycane par des liaisons O-glycosidiques dont l'anométrie (α ou β) reste à élucider (Veerkamp *et al.*, 1983).

Fischer caractérise par spectroscopie RMN un hétéropolysaccharide constitué de 16 à 26 unités monosaccharidiques (Tableau G2, page 10) attachées aux acides lipotéichoïques de *B. bifidum* DSM 20239 (Fischer, 1987; Fischer *et al.*, 1987). De même, Op den Camp et collaborateurs mettent en évidence en 1984 une structure homopolysaccharidique constituée de résidus de galactofuranose liés en β -1,5 et attachée aux acides lipotéichoïques de *B. bifidum* (Op den Camp *et al.*, 1984).

Tableau G2. Structure de plusieurs oligosaccharides identifiés chez sept espèces de *Bifidobacterium*.

Souche	Structure du polysaccharide	Références	
<i>B. adolescentis</i> YIT 4011	$\rightarrow 3)$ -dTal- β -1,3-dTal- β -1,3-dTal- β -1,2- dTal- α -1,2- dTal- α -1,2- dTal- α - \uparrow \uparrow \uparrow \uparrow \uparrow \uparrow Glc Glc Glc Glc Glc Glc *	Nagaoka <i>et al.</i> ,1988.	
<i>B. bifidum</i> YIT 4007	$\rightarrow 3)$ α Rha (1 \rightarrow 2) α Rha (1 \rightarrow \uparrow β -1,2 Glc	Habu <i>et al.</i> , 1987	
<i>B. bifidum</i> var. <i>pennsylvanicus</i>	$\rightarrow 2)$ α -L-Rha (1 \rightarrow 2) α -L-Rha α (1 \rightarrow \uparrow α -1,3 Glc	$\rightarrow 2)$ α -L-Rha (1 \rightarrow 3) α -L-Rha α (1 \rightarrow \uparrow β -1,2 Glc	Veerkamp <i>et al.</i> , 1983
<i>B. bifidum</i> var. <i>pennsylvanicus</i>	H-[5- β-D-Gal_f 1]_n-[6- β-D-Glc_p 1]_m-6Gal_p ; n =7 à 10; m =8 à 15;	Fischer, 1987; Iwasaki <i>et al.</i> , 1990	
<i>B. breve</i> YIT 4010	$\rightarrow 3)$ β Glc (1 \rightarrow 3) β Gal (1 \rightarrow 4) α Gal (1 \rightarrow 2) α Glc (1 \rightarrow \uparrow α -1,6 Glc	Habu <i>et al.</i> , 1987	
<i>B. breve</i> YIT 4010	H-[5- β-D-Gal_f 1]_n-[6- β-D-Glc_p 1]_m-6Gal_p ; n =7 à 10; m =8 à 15;	Iwasaki <i>et al.</i> , 1990	
<i>B. catenulatum</i> YIT 4016	$\rightarrow 6)$ β -D-Gal _f (1 \rightarrow 5) β -D-Gal _f (1 \rightarrow \uparrow α -1,6 D- Gal _p	Nagaoka <i>et al.</i> , 1996	
<i>B. longum</i> YIT 4028	$\rightarrow 2)$ α -L-Rha _p (1 \rightarrow 3) α -D- Gal _p (1 \rightarrow 2) α -L-Rha _p (1 \rightarrow 3) α -D- Gal _p (1 \rightarrow \uparrow α -1,6 D- Gal _p	Nagaoka <i>et al.</i> , 1995	
<i>B. longum</i> YIT 4021	H-[5- β-D-Gal_f 1]_n-[6- β-D-Glc_p 1]_m-6Gal_p ; n =7 à 10; m =8 à 15;	Iwasaki <i>et al.</i> , 1990	
<i>B. longum</i> biovar. <i>infantis</i> ATCC 15697	$\rightarrow 3)$ β -D-Gal _f (1 \rightarrow 3) α -D- Gal _p (1 \rightarrow \uparrow β -1,6 \uparrow β -1,6 D-Glc _p D-Glc _p	Tone-Shimokawa <i>et al.</i> , 1995	

Les structures en gras font partie de la partie glucidique des acides lipotéichoïques.

* L'anométrie de la liaison glycosidique réalisée entre le déoxytalose (dTal) et le D-glucose reste à élucider.

Ces auteurs ne rattachent toutefois pas ces résultats avec la capacité de certaines souches de *B. bifidum* à produire des exopolysaccharides.

En 1995, Andaloussi et collaborateurs isolent et caractérisent un exopolysaccharide produit par *B. longum* (Andaloussi *et al.*, 1995). Ces auteurs montrent qu'après 48 h de culture, cette espèce synthétise une grande quantité d'exopolysaccharides (140 mg/L de milieu, soit 30% des polysaccharides totaux produits par la cellule). Cet EPS semble attaché à la paroi cellulaire par des ponts de nature peptidique. En effet, après traitement à la pronase, cet EPS a pu être isolé et analysé. Deux des fractions oligosaccharidiques ainsi obtenues ont été caractérisées plus en détail. Les deux sous fractions seraient constituées d'unités répétitives constituées de glucose, galactose, d'acide uronique et d'hexosamines. Cependant, la structure exacte de ces unités monomériques et la nature des liaisons impliquées dans la réalisation de ces structures restent à élucider.

I. 3. 1. 2. 3. Informations génétiques

Dans leur analyse bioinformatique de la séquence du chromosome de *B. longum* NCC2705, Schell et collaborateurs (2002) ont identifié un fragment de 42 kb (BL 0205-BL0237) qui serait impliquée dans la production de rhamnoexopolysaccharides (Schell *et al.*, 2002). En effet, ce fragment chromosomique regroupe plusieurs cadres de lecture codant putativement pour différentes glycosyltransférases, ainsi que pour des enzymes responsables de l'exportation des structures polysaccharidiques (Schell *et al.*, 2002). L'analyse de la composition en GC de ce fragment d'ADN suggère son acquisition par transfert horizontal à partir de *Streptococcus* sp.

I. 3. 1. 3. Les acides téichoïques

Les acides téichoïques sont des polyols constitués d'un nombre variable de résidus de glycérol, ribitol et mannitol liés de façon covalente entre eux et au peptidoglycane par l'intermédiaire de liaisons phosphodiester (Kaiser, 2001). Lorsque ces structures sont liées aux lipides de la membrane plasmique, ils sont appelés acides lipotéichoïques. Les fonctions hydroxyles des acides (lipo)téichoïques sont souvent éthérifiées par les résidus hydroxyles des monosaccharides neutres ou aminés, ou estérifiées par les fonctions carboxyliques des D-aminoacides.

Plusieurs équipes ont analysé par chromatographie en couche mince et par résonance magnétique du proton, du ^{13}C et du ^{31}P la structure des acides téichoïques et lipotéichoïques isolés à partir de la paroi cellulaire de *B. bifidum* (Veerkamp et Van Schaik, 1974, Op den Camp *et al.*, 1984; Fischer *et al.*, 1987; Iwasaki, 1990).

i) Informations sur la structure des acides téichoïques

En 1983, Veerkamp et ses collaborateurs ont analysé la structure d'un acide téichoïque riche en résidus mannitol, lié au peptidoglycane de *B. bifidum* par des liaisons glycosidiques (Veerkamp *et al.*, 1983). Ils ont constaté que cet acide téichoïque est composé d'une chaîne polymérique de β -1,2 ou β -1,3 rhamnose substituée toutes les deux unités par un résidu de

glucose. A cette chaîne se fixent, par des liaisons phosphodiester, des oligomères de 4,6-mannitol phosphate.

ii) Informations sur la structure des acides lipotéichoïques

Op den Camp, Fischer et leurs collaborateurs ont analysé la structure de différents acides lipotéichoïques de *B. bifidum* (Op den Camp *et al.*, 1984; Fischer *et al.*, 1987). En 1984, Op den Camp et ses collègues ont caractérisé une molécule d'acide lipotéichoïque constituée d'une séquence glycolipidique substituée par du 1,2-polyglycérolphosphate. A l'extrémité distale de ce polyglycérolphosphate ils ont détecté des chaînes linéaires constituées de β -D-1,5- galactofurananne (Op den Camp *et al.*, 1984). Trois ans plus tard, Fischer et ses collaborateurs déterminent la structure d'un autre acide lipotéichoïque. Cette molécule est composée d'une séquence glycolipidique substituée par des résidus de monoglycérolphosphate auxquels sont attachés des résidus de β -D-glucose et de β -D-galactose (Fischer *et al.*, 1987, Fischer, 1987). Ce dernier type d'acide lipotéichoïque est détecté aussi par Iwasaki chez trois espèces de *Bifidobacterium* (*B. bifidum*, *B. breve* et *B. longum*) (Iwasaki *et al.*, 1990).

I. 3. 2. Le matériel génétique

I. 3. 2. 1. Le chromosome bactérien

Pour le genre *Bifidobacterium*, le pourcentage de G+C de l'ADN génomique peut varier de 57,2 à 64,5 moles% (soit une moyenne de 60,1 moles%) (Werner et Seeliger, 1963; Sebald *et al.*, 1965). Ce genre fait ainsi partie de la classe des bactéries à Gram positif à haut pourcentage en GC. Cette caractéristique constitue un critère taxonomique dans la différenciation des bifidobactéries des espèces à Gram positif et surtout du genre *Lactobacillus* dont le pourcentage en G+C est inférieur à 50% (Gasser et Mandel, 1968).

Le chromosome des bifidobactéries est circulaire et mesure en moyenne 2 Mb. La taille exacte a été déterminée pour deux espèces: 2,1 Mb pour *B. breve* CIP6469 (Bourget *et al.*, 1993) et 2,26 Mb pour *B. longum*. NCC2705 (Schell *et al.*, 2002).

Actuellement, seule la séquence chromosomique de l'espèce *Bifidobacterium longum* est connue. Ainsi, O'Sullivan et ses collaborateurs (2002), ont communiqué la séquence de 2,375 Mb du chromosome de *B. longum* DJ010A (www.jgi.doe.gov/JGI_microbial/html/). Cette séquence génomique, incomplètement annotée a constitué une première dans la série des projets de séquençage des génomes des commensaux humains. Cette information a été suivie, la même année, par la publication de la séquence génomique intégrale et entièrement annotée de *B. longum* NCC2705 (<http://gib.genes.nig.ac.jp>). Par analyse bioinformatique 1730 séquences codantes (soit 86% du chromosome) ont été prédites (Schell *et al.*, 2002). Chez cette souche, 3% du matériel génétique semble être acquis par transfert horizontal et par duplication génétique.

I. 3. 2. 2. Les éléments extrachromosomiaux

I. 3. 2. 2. 1. Les plasmides

La présence de plasmides a été détectée chez cinq espèces de *Bifidobacterium*: *B. asteroides*, *B. breve*, *B. globosum*, *B. longum* et *B. indicum* (Sgorbati *et al.*, 1982, Iwata *et al.*, 1989, O'Riordan *et al.*, 1999). *B. longum* et *B. asteroides* peuvent posséder conjointement différents plasmides par cellule (Sgorbati *et al.*, 1986; 1988; Tableau G3, page 12).

La taille des plasmides isolés chez *Bifidobacterium* varie de 1900 pb (pMB1, *B. longum* 2577, Rossi *et al.*, 1996) à 10224 pb (pNAC3, *B. longum* RW041, Corneau *et al.*, 2004).

La stabilité de ces plasmides a été testée dans deux cas: le plasmide pKJ50 de *B. longum* KJ et le plasmide pCIBb1 *B. breve* NCFB 2258 (Park *et al.*, 1999; O'Riordan et Fitzgerald, 1999). Dans les deux cas, les deux souches ont été cultivées longuement *ex vivo*, en absence de facteurs de sélection. Malgré ces conditions non sélectives, les deux plasmides ont été conservés par la bactérie.

La séquence nucléotidique de cinq plasmides isolés à partir de quatre espèces de *Bifidobacterium* a été déterminée (Tableau G3, page 12). Quatre de ces plasmides sont extrachromosomiaux. Seul le plasmide pBILO1 est intégré dans le chromosome de *B. longum* NCC2705 (Schell *et al.*, 2002). L'analyse bioinformatique de ces séquences a permis l'identification de quatre familles de protéines probablement impliquées dans la division cellulaire et dans le maintien et le transfert du plasmide (Rep, Mob, Tra, FtsK) ainsi qu'une classe de protéines (Memb) dont la fonction reste inconnue (Tableau G3, page 12).

Les mécanismes impliqués dans le transfert et la réplication des plasmides chez *Bifidobacterium* sp. ne sont pas encore parfaitement identifiés. Nous synthétiserons ici les informations bibliographiques liées à ces deux processus chez *Bifidobacterium* sp.

I. 3. 2. 2. 1. 1. Transfert des plasmides par conjugaison

Généralités

Les informations portant sur le transfert des plasmides par conjugaison chez les bactéries à Gram positif ont été récemment synthétisées dans une revue bibliographique publiée par Grohmann et ses collaborateurs (Grohmann *et al.*, 2003). Selon ces auteurs, ce mécanisme de transfert d'ADN se réalise en deux étapes. Dans un premier temps, il se réalise un contact entre les deux cellules partenaires, donatrice et acceptrice, par l'intermédiaire des protéines de couplage. Puis, le complexe ADN-protéines est transféré d'une cellule à l'autre, à l'aide des ATP-ases de la superfamille AAA (ATP-ases Associées à différentes Activités cellulaires) et des transglycosylases (impliquées dans l'ouverture locale du peptidoglycane).

Dans la grande majorité des genres bactériens à Gram positif, le transfert plasmidique par conjugaison se réalise sous la forme d'un intermédiaire monobrin (l'ADN_{ss} ou single stranded DNA) (Grohmann *et al.*, 2003). La transformation de l'ADN plasmidique double brin (l'ADN_{ds} ou double stranded DNA) en ADN_{ss} est réalisée par une

Tableau G3. Proteine identificate prin analiza bioinformatica a secventei nucleotidice a unor plasmide evidentiata in patru specii de *Bifidobacterium*.

Espèce	Souche	Plasmides	Taille de la séquence plasmidique (pb)	Protéines putatives détectées	Références
<i>B. asteroides</i>	DSM 200089	pAP1	2100	RepA	Kaufmann et al., 1997.
<i>B. breve</i>	NCFB2258	pCIBb1	5750	Rep, Par, FtsK	O'Riordan et al., 1999.
<i>B. longum</i>	NCC2705	pBLO1	3600	MobA, Rep, ParA, StbB	Schell et al., 2002
	VMKB44	pB44	ND	Rep,	Smeianov et al., 2001
	DJ010A	pDOJH10L	ND	MobA, MobB, RepA, RepB, MembA, MembB,	Lee et al., 2002.
		pDOJH10S	ND	MobB, RepA,	Lee et al., 2002
	KJ	pKJ36	ND	MobB, RepB, MembB,	Ji et al., 1999.
		pKJ50	4950	MobA, RepA, ORFII,	Park et al., 1999.
	<i>longum</i> B2577	pMB1	1900	ORF1, ORF2	Rossi et al., 1996.
	RW048	pNAC1	ND	RepB,	Corneau et al., 2002.
	RW041	pNAC2	ND	Mob, RepB,	Corneau et al., 2002
pNAC3		ND	RepB,	Corneau et al., 2002	
<i>B.pseudocatenulatum</i>	VMKB4M	p4M	ND	RepA, Tra,	Smeianov et al., 2001

Referintele notate in gras au fost obtinute utilizand secventele nucleotidice si proteice din bazele de date bioinformatic (www.ncbi.com) si nu constituie subiectul unui articol publicat.

Mob = proteina de mobilizare, probabil implicata in mecanismele de tranfer genetic prin conjugare.
Memb = proteina probabil transmembranara.

Rep = proteina implicata in replicarea plasmidiana.

Par = proteina de partitie (implicata in mecanismul de transfer al plasmidului in descendenta).

Stb = protéine impliquée dans le maintien du plasmide dans la cellule.

Tra, FtsK = protéines probablement impliquées dans la division cellulaire.

classe d'enzymes appelées relaxases, telles que les protéines Tra et Mob. Ces enzymes coupent les liaisons phosphodiester de l'ADN_{ds} au niveau d'un site spécifique de clivage (*nic*) du locus *oriT*. Par l'étude des alignements des séquences nucléotidiques des locus *oriT* des plasmides détectés chez *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Thiobacillus ferrooxidans*, *Streptomyces lividans* et *Salmonella* sp., Kurenbach, Zechner et collaborateurs ont détecté un motif consensus au niveau du site *nic*, dont la structure est la suivante: 5'-NcgtNtaAgtGCGCcCTta-3' (Kurenbach *et al.*, 2002; Zechner *et al.*, 2000). Les mêmes auteurs regroupent ces plasmides dans une famille appelée RSF1010-*oriT*.

La structure et le rôle des relaxases Tra ont été étudiés plus en détail chez *Streptomyces* sp. par Kosono et ses collaborateurs (Kosono *et al.*, 1996). Ces protéines Tra présentent deux motifs consensus au niveau de leur séquence en acides aminés: un site de fixation à l'ADN conservé chez plusieurs plasmides détectés chez *Streptomyces* sp. dont la structure est la suivante: GxxGSGKT, et le motif pentapeptidique RaaGi. Ces motifs, spécifiques des protéines SpoIII E/ FtsK (appelées aussi protéines de translocation à travers le septum) sont capables de transférer à travers le septum des *Actinobacteria* l'ADN double brin (Grohmann *et al.*, 2003).

Transfert des plasmides entre deux souches de *Bifidobacterium* sp.

Le traitement informatique de la séquence du plasmide pKJ50 de *B. longum* a mis en évidence un fragment nucléotidique de 1035 pb qui présente 55% d'identité avec une protéine MobA des entérobactéries (Park *et al.*, 1999). Cette séquence possède le locus *oriT* et le motif spécifique de la famille RSF1010-*oriT* sous la forme 5'-ACATGTAAGTGCGCCCTCA-3' (soit 98,5% d'identité avec le motif formulé par Grohmann, Kurenbach et collaborateurs) (Grohmann *et al.*, 2003; Kurenbach *et al.*, 2002). Ce motif consensus est précédé par deux séquences inversées répétées de type IRVI (Inverted Repeat VI) couramment retrouvées en amont des régions *oriT*. (Park *et al.*, 1999). Par traitement du plasmide pKJ50 à l'endonucléase S₁ (qui agit uniquement sur l'ADN_{ss}), Park et ses collègues mettent en évidence l'accumulation d'ADN monobrin dans les cellules de *B. longum* possédant ce plasmide (Park *et al.*, 1999). Ces auteurs d'une part, Grohmann et son équipe d'autre part, concluent que le transfert du plasmide pKJ 50 entre deux souches de *B. longum* se réaliserait par un mécanisme "classique" qui implique une relaxase (la protéine Tra) et un intermédiaire ADN_{ss}.

Le plasmide pCIBb1 de *B. breve* possède un ORF (Open Reading Frame ou cadre ouvert de lecture) de 861 pb qui coderait pour une protéine qui présente 27% d'identité avec la protéine Tra identifiée chez *Streptomyces* sp. (O'Riordan et Fitzgerald, 1999). L'analyse bioinformatique de la séquence en acides aminés a révélé un site potentiel de fixation à l'ADN (GipGSGKT) et le motif pentapeptidique (RaaGi) sous la forme RsgGf (Grohmann *et al.*, 2003). Un autre homologue de la protéine Tra a été caractérisé par traitement bioinformatique de la séquence du plasmide p4M de *B. pseudocatenulatum* (Smeianov *et al.*, 2002; Grohmann *et al.*, 2003; AF359574). Un deuxième type de transfert plasmidique similaire au système de transfert décrit chez *Streptomyces* sp., impliquant une protéine de translocation septale existerait donc chez *Bifidobacterium* sp. (Grohmann *et al.*, 2003).

I. 3. 2. 2. 1. 2. Réplication plasmidique

Chez les bactéries à Gram positif, deux mécanismes de réplication de l'ADN plasmidique ont été décrits: le mécanisme de type Rolling-Circle (RC) et la théta réplication (del Solar *et al.*, 1993). Les réplicons de type RC possèdent tous trois caractéristiques structurales communes: un gène codant pour une protéine de replication (*rep*), un site de fixation de la protéine Rep appelé dso (double-stranded origin of replication) et une séquence nucléotidique spécifique nommée sso (single- stranded origin of replication).

Sur la séquence du plasmide pCIBb1 de *B. breve*, O'Riordan et Fitzgerald (1999) ont détecté une séquence nucléotidique de 1143 pb qui présente 21 % d'identité avec la protéine Rep du plasmide pIJ101 de *Streptomyces lividans*. Une séquence de type *nic* se trouvait à 410 pb en amont de ce gène. Elle serait impliquée dans le mécanisme de réplication de type RC et dans le transfert plasmidique par conjugaison (O'Riordan et Fitzgerald, 1999; Waters et Guiney, 1993). De plus, l'analyse *in silico* de la séquence nucléotidique de pCIBb1 a révélé trois motifs peptidiques caractéristiques des protéines impliquées dans le mécanisme de réplication de type RC chez les phages et les plasmides des bactéries à Gram positif (Muth *et al.*, 1995). Toutes ces informations, corroborées par la présence de l'ADN_{ss} dans la cellule de *B. breve* portant le plasmide pCIBb1 ont amené O'Riordan et Fitzgerald (1999) à conclure que ce vecteur se réplique par un mécanisme de type RC.

I. 3. 2. 2. Les bactériophages et les prophages

I. 3. 2. 2. 1. Les bactériophages

Les bactériophages sont des virus capables d'infecter une cellule bactérienne. Un bactériophage spécifique de *B. adolescentis* et de *B. longum* a été identifié dans les fèces humain par Youssef (1966). D'autres bactériophages, spécifiques de *B. longum* (Sgorbati, 1983) et *B. thermophilum* (Dentan *et al.*, 1970; Matteuzzi et Sozzi, 1971) ont été isolés et partiellement caractérisés (Tableau G4, page 17). Pour l'instant, aucun outil génétique n'a été développé à partir des phages de *Bifidobacterium* sp.

I. 3. 2. 2. 2. Les prophages

Un prophage est un fragment d'ADN phagique intégré dans le chromosome bactérien.

Des structures nucléotidiques de provenance phagique ont été mises en évidence lors du séquençage du génome des deux souches de *B. longum* (DJ010A et NCC2705). Dans les deux cas il s'agit d'un seul module d'environ 15 kb qui aurait perdu presque entièrement les gènes lui permettant d'effectuer un cycle lysogénique complet (un tel prophage est dit "remnant").

Chez *B. longum* NCC2705 ce prophage contiendrait des gènes codant pour deux classes de protéines: une première classe regroupe une partie des protéines structurales tandis que la deuxième classe réunit quelques unes des enzymes impliquées dans les processus de lyse et d'intégration. Par contre, le prophage remnant détecté chez *B. longum*

Tableau G4. Caractéristiques de trois bactériophages identifiés chez trois espèces de bifidobactéries.

Espèce bactérienne	Caractéristiques de la tête	Caractéristiques de la queue	Références
<i>B. thermophilum</i>	Octaèdre, 0,6 nm en diamètre	2,150 nm longueur 0,11 nm diamètre	Deutan <i>et al.</i> , 1970
<i>B. adolescentis</i>	0,4 nm	1,7 nm longueur 0,15 nm diamètre	Youssef <i>et al.</i> , 1970
<i>B. longum</i>	49 à 56 nm	76 à 268 nm longueur	Sgorbati, 1983.

DJ010A semble posséder tous les gènes nécessaires à la synthèse des éléments structuraux phagiques. (Canchaya *et al.*, 2003).

I.4. Physiologie du genre Bifidobacterium

I. 4. 1. Anaérobiose

I. 4. 1. 1. Généralités

i) Définition

Les bactéries aérobies et aérotolérantes utilisent l'oxygène (O₂) comme accepteur final d'électrons. Chez ces organismes, la croissance en aérobiose se traduit par conversion d l'O₂ en eau (H₂O). Par opposition, chez les microorganismes anaérobies, l'O₂ est une molécule toxique.

ii) Toxicité de l'O₂ et des espèces actives de l'O₂

Lors de la réduction de l'O₂ en eau, il y a formation de deux espèces actives de l'oxygène, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et l'anion superoxyde (O₂⁻) (Fridovich, 1978). Ces espèces peuvent aussi apparaître lors des processus d'autoxydation de certaines molécules enzymatiques (deshydrogénases et oxydases), ou non enzymatiques (thiols, catéchols et flavines) (Finegold et George, 1989). Le peroxyde d'hydrogène peut interagir, selon la réaction de Fenton, avec les ions des métaux de transition (tels que le Fe²⁺) conduisant à la formation d'un oxydant plus puissant que l'O₂, le radical hydroxyle (HO[·]) (McCord et Day, 1978):

Les radicaux libres hydroxyles interagissent avec les lipides, les protéines et l'ADN et induisent des changements irréversibles dans ces structures (Farr et Kogoma, 1991; Imlay et Linn, 1988; Storz *et al.*, 1990). Par exemple, ces radicaux hydroxyles peuvent disloquer le fer présent dans les clusters de type [4Fe -4S] des déshydratases (telles que l'aconitate déshydratase et la fumarase) ou des protéines stockant le fer (ferritine, bactérioferritine) dans la cellule bactérienne (Gardner et Fridovich, 1991; Liochev et Fridovich, 1992).

Il a été montré que pour trois organismes aérobies (*E. coli*, *Salmonella typhimurium* et *Bacillus subtilis*) et un organisme anaérobie aérotolérant (*Bacteroides fragilis*), le stress induit par l'O₂ et ses produits de transformation conduit, au niveau physiologique, à la synthèse de plus de 28 nouvelles enzymes (Farr et Kogoma, 1991, Antelmann *et al.*, 1997; Rocha *et al.*, 1998). Selon plusieurs auteurs, (Rocha et Smith, 1998; Storz *et al.*, 1990), les bactéries emploient deux mécanismes de protection capables de contrecarrer les effets nocifs de l'O₂ dans la cellule:

- une transformation enzymatique des espèces actives de l'oxygène en produits non-toxiques. En effet, les enzymes catalase, NAD(P)H oxydase et NAD(P)H- peroxydase empêchent l'accumulation de H₂O₂ dans la cellule, tandis que la superoxyde dismutase (SOD) transforme l'anion O₂⁻ en H₂O₂ et O₂.

- une "réparation" enzymatique des dégâts produits par l'O₂ et par ses produits de transformation (O₂⁻, H₂O₂, HO[·]) envers les macromolécules.

Selon Rocha et collaborateurs (1996), l'absence de ces mécanismes de protection constitue le facteur responsable de la sensibilité des bactéries anaérobies envers l'O₂ (Rocha *et al.*, 1996).

I. 4. 1. 2. L'anaérobiose et les bifidobactéries

Les bifidobactéries sont considérées comme des bactéries anaérobies strictes (Scardovi, 1986). Toutefois, certaines souches sont microaérotolérantes. Comme tout organisme microaérotolérant, elles posséderaient des mécanismes de résistance leur permettant de survivre en présence de faibles quantités d'oxygène. (De Vries et Stouthamer, 1969; Uesugi et Yajima, 1978; Kaneko *et al.*, 1985, Shimamura *et al.*, 1990; Shimamura *et al.*, 1992).

i) Activités NADH-oxydase et NADH-peroxydase chez *Bifidobacterium* sp.

Shimamura et collaborateurs (1992) ont réalisé une étude menée sur quatre espèces de *Bifidobacterium* d'origine intestinale humaine (*B. adolescentis*, *B. breve*, *B. longum* biovar. *infantis* et *B. longum* biovar. *longum*) dans le but de caractériser le devenir de l'O₂ chez ces espèces.

Pour ce fait, la croissance des quatre espèces (illustrée par la variation de l'absorbance de la culture bactérienne à 660 nm) a été mesurée en présence de différentes quantités d'oxygène (culture en anaérobiose totale, culture en aérobiose partielle créée par agitation occasionnelle du milieu et culture aérobie réalisée par agitation continue du milieu). Aucune des quatre espèces étudiées n'a été capable de croître en conditions d'aérobiose. La présence de faibles quantités d'oxygène entraîne, chez trois espèces de *Bifidobacterium* (*B. breve*, *B. longum* biovar. *infantis* et *B. longum* biovar. *longum*) une croissance de l'ordre de 75% de celle obtenue en phase anaérobie (cette valeur est atteinte après 1- heures de culture). Seule l'espèce *B. adolescentis* testée manifeste un caractère anaérobie strict.

Dans un deuxième temps, ces auteurs ont réalisé des dosages par voies enzymatiques de l'accumulation de l' H₂O₂ dans la cellule et de l'activité des quatre enzymes normalement impliquées dans le métabolisme des espèces actives de l'oxygène: la NADH-oxydase, la catalase, la NADH-peroxydase et la superoxyde dismutase (SOD).

B. breve, *B. longum* biovar. *infantis* et *B. longum* biovar. *longum* synthétisent, en conditions d'aérobiose, du peroxyde d'hydrogène. Deux enzymes pourraient être responsables de la transformation de l'O₂ en H₂O₂: la catalase ou la NADP-oxydase. Les auteurs constatent qu'en absence de NADH exogène, l'extrait cellulaire de ces trois espèces n'est pas capable de transformer l'O₂ en eau. Ils concluent que ces trois espèces possèdent une activité NADH-oxydase qui permet la transformation de l'oxygène du milieu en peroxyde d'hydrogène.

Quelle que soit la quantité d'oxygène présente dans le milieu de culture de *B. adolescentis* (aérobiose totale ou partielle), la présence de cette molécule induit chez cette espèce un effet identique: synthèse d'une faible quantité d' H₂O₂ (6,8 à 7,6 nmoles d' H₂O₂

produits par mL de culture, soit 18% d'activité NADH-oxydase par rapport à *B. longum*) accompagnée d'un faible taux de croissance.

Selon ces auteurs, l'O₂ intracellulaire est converti par une NADH-oxydase en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Ce dernier serait le substrat d'une NADH-peroxydase qui le réduirait en eau. L'ensemble des quatre extraits cellulaires de *Bifidobacterium* sp. étudiés expriment une très faible activité SOD (Shimamura *et al.*, 1992).

ii) Informations génétiques

L'analyse *in silico* de la séquence du génome de *B. longum* NCC2705 indique la présence d'un cadre de lecture codant pour une NADH-oxydase putative (gène *nox*, BL 1266). Les deux autres enzymes potentiellement impliquées dans la dégradation des produits de transformation d'oxygène, la NADH-peroxydase et la superoxyde dismutase, n'apparaissent pas lors de l'analyse bioinformatique de la séquence chromosomique de *B. longum* NCC2705 (Schell *et al.*, 2002).

Toutefois, Schell et collaborateurs (2002) mettent en évidence la présence de trois ORF codant probablement pour trois protéines impliquées dans la préservation des structures protéiques et lipidiques contre les dégâts induits par les espèces activées de l'oxygène: une thiol peroxydase (gène *bcp*, BL 0821), une alkyl hydroperoxyde réductase (gène *ahpC*, BL 0615) et une peptide méthionine sulfoxyde réductase (gène *msrA*, BL0568) (Schell *et al.*, 2002).

iii) Conclusion

Selon Condon (1987), chez les bactéries lactiques, il existerait deux types de NADH-oxydases:

- une NADH-oxydase qui réduit l'oxygène en H₂O₂ par la participation de deux électrons (telle que l'enzyme décrite par Shimamura *et al.*, 1992),
- et un deuxième type de NADH-oxydase qui réduit l'O₂ directement en eau et requiert la participation de quatre électrons. Cette théorie serait confirmée par Cox et Marling (1992) qui ont constaté que l'extrait cellulaire de *B. bifidum* DSM 20082 présente une activité NADH-oxydase qui correspond à une réduction directe de l'O₂ en H₂O. (Cox et Marling, 1992).

Des études du produit d'expression du gène *nox* identifié chez *B. longum* NCC2705 restent à entreprendre, de manière à établir quel type de NADH-oxydase est présente chez les espèces de *Bifidobacterium* microaérotolérantes.

I. 4. 2. Température et pH

Les souches de *Bifidobacterium* implantées chez l'Homme présentent un optimum de croissance pour des valeurs de température comprises entre 36 et 38°C, alors que pour les souches d'origine animale, ce palier est plus élevé et peut atteindre 46,5°C. La croissance des bifidobactéries s'arrête pour des températures inférieures à 25°C (Buchanan et Gibbons, 1974; Gavini *et al.*, 1991).

Les membres du genre *Bifidobacterium* sont des microorganismes acidophiles, possédant un optimum de croissance situé entre 6 et 7 unités de pH. Ce caractère

phénotypique peut être utilisé en tant que facteur de sélection dans les milieux de culture (Beerens, 1990). Pour des valeurs de pH inférieures à 5 et supérieures à 8 il n'y a plus de croissance cellulaire (Scardovi, 1986).

I. 4. 3. Résistance aux antibiotiques

L'étude de la susceptibilité de différentes espèces de *Bifidobacterium* envers certains antibiotiques a pour but de définir des milieux de culture sélectifs et d'analyser les effets des traitements aux antibiotiques sur la flore bifidogène (Lim *et al.*, 1993).

Ainsi, il a été démontré que les bifidobactéries sont résistantes vis-à-vis de nombreux antibiotiques tels que la kanamycine, la néomycine, la streptomycine, la polymycine, la gentamicine, l'acide nalidixique et le métronidazole (Scardovi, 1996).

La bacitracine, le chloramphénicol, l'ampicilline et la pénicilline ont une activité bactériostatique envers *B. adolescentis*, *B. bifidum* et chez *B. longum*. L'action de la tétracycline dépend de la souche étudiée (Mateuzzi *et al.* 1983).

I. 4. 4. Effets des sels biliaires

Chez les mammifères, les sels biliaires sont hydrolysés dans la partie distale de l'intestin grêle et dans le gros intestin par les espèces appartenant aux genres *Bacteroides* (Stellwag *et al.*, 1976), *Bifidobacterium* (Grill *et al.*, 1995; Tanaka *et al.*, 2000), *Clostridium* (Gopal- Srivastava et Hylemon, 1988) et *Lactobacillus* (Lundeen et Savage, 1992). Elle ne concerne que 20% des sels biliaires produits par le foie, car le reste est absorbé dans le duodénum et intègre la circulation sanguine portale.

Selon Tanaka et collaborateurs (2000), les bifidobactéries possèdent une enzyme, la cholyglycine hydrolase (EC 3.5.1.24., gène *bsh*) qui hydrolyse les sels biliaires (glyco- ou taurocholates) en acides aminés (glycine et taurine) et acides biliaires (acide cholique et acide chénodéoxycholique) (Tanaka *et al.* 2000). Les produits obtenus après déconjugaison des sels biliaires constituent une source de nutriments (les acides aminés) et d'énergie (fournie par la déshydroxylation des acides biliaires) pour ces microorganismes. Par contre, la formation des acides biliaires secondaires (acides déoxycholique et lithocholique) est souvent associée avec un effet bactériostatique, ou bactéricide envers les bifidobactéries (Catteau *et al.*, 1971).

I. 5. Taxonomie du genre Bifidobacterium

I. 5. 1. Généralités

A ce jour le genre *Bifidobacterium* compte 30 espèces dont 15 d'origine humaine, 15 d'origine animale et 4 d'origine environnementale (Tableaux G5A, G5B et G5C, pages 23, 24 et 25). Dans ce sous chapitre seront présentées les techniques les plus utilisées actuellement par les taxonomistes pour l'identification, au niveau d'espèce et de souche, des membres du genre *Bifidobacterium*.

Le diagnostique de genre, espèce et souche sert non seulement à la découverte de nouveaux membres du genre *Bifidobacterium*, mais aussi à la validation ou à l'invalidation des espèces "statutaires" et à l'identification et quantification de ces microorganismes.

Par exemple, les techniques de biologie moléculaire ont permis à Jiang et Dong (2002) d'exclure du genre *Bifidobacterium* deux espèces identifiées en 1996 par Crociani et collaborateurs, *B. denticolens* et *B. inopinatum* et de décrire une nouvelle espèce, *B. scardovii* (Jiang et Dong, 2002; Hoyles *et al.*, 2002).

I. 5. 2. Diagnostique taxonomique

I. 5. 2. 1. Le genre *Bifidobacterium*

Le diagnostique de genre repose sur trois types de critères complémentaires:

- morphologiques: bacilles à Gram positif, de forme irrégulière, présentant souvent des branchements ou des extrémités bifides
- physiologiques: bactéries immobiles, anaérobies, produisant de l'acide acétique et lactique dans un rapport molaire 3:2 à partir des hexoses, présence d'une fructose-6-phosphate phosphocétolase (F6PPK) et absence d'activité catalasique.
- génétiques: pourcentage en GC important (55 à 67 %) et identité de séquence des gènes codant pour l'ARNr 16S et pour la protéine de stress HSP 60 supérieure à 80% (Scardovi, 1986, Satokari *et al.*, 2001, Jian *et al.*, 2001). De plus, pour appartenir au même genre, deux espèces doivent avoir un pourcentage d'homologie en séquence ADN supérieur ou égal à 30%, avec une variation du profil d'élution thermique inférieure à 5°C (Wayne *et al.*, 1987 ; Bahaka *et al.*, 1993).

Cependant, de nombreux paramètres (les conditions de culture, la composition du milieu de culture) influencent l'expression de certains gènes et, par conséquent, la morphologie et le profil électrophorétique des extraits cellulaires de *Bifidobacterium* sp. De plus, l'enzyme clé du métabolisme des hexoses chez les bifidobactéries, la fructose 6-phosphate phosphocétolase (F6PPK) n'est pas caractéristique du genre *Bifidobacterium*. En effet, cette enzyme a été détectée chez *Gardnerella vaginalis* et *Leuconostoc* sp. Seule aujourd'hui en France la galerie ID32A (Biomérieux, département API) permet la détection

Tableau 5A. Espèces de bifidobactéries d'origine humaine.

Espèce	Souche type	Niche écologique	Référence
<i>Bifidobacterium asolescentis</i>	ATCC 15703 = DSM 20083	intestin adulte	Reuter, 1963
<i>Bifidobacterium angulatum</i>	ATCC2753 5= DSM = 20098	intestin adulte	Scardovi et Crociani, 1974
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	ATCC 29521 = DSM 20456	intestin (enfant, adulte), vagin	Tissier, 1900
<i>Bifidobacterium breve</i>	ATCC 15700 = DSM20213	intestin enfant, vagin	Reuter, 1963
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	ATCC 27539 = DSM 20103	intestin (enfant, adulte), vagin	Scardovi et Crociani, 1974
<i>Bifidobacterium dentium</i>	ATCC 27534 = DSM 20436	cavité buccale (caries dentaires), intestin adulte, vagin	Scardovi et Crociani, 1974
<i>Bifidobacterium gallicum</i>	ATCC 49850 = DSM 20093	intestin adulte	Lauer, 1990
<i>Bifidobacterium longum</i> , <i>biovar longum</i>	ATCC 15707 = DSM 20219	intestin (enfant, adulte), vagin	Reuter, 1963
<i>Bifidobacterium longum</i> , <i>biovar infantis</i>	ATCC 15697 = DSM 20088	intestin enfant, vagin	Reuter, 1963; Sakata <i>et al.</i> , 2002
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	ATCC 27919 = DSM 20438	intestin enfant	Scardovi <i>et al.</i> 1979
<i>Bifidobacterium scardovii</i>	DSM 13734	intestin	Hoyles <i>et al.</i> , 2002
<i>Bifidobacterium urinalis</i>	ND*	tractus urogénital	Hoyles <i>et al.</i> , 2000.

*ND= non définie

Tableau G 5B. Espèces de bifidobactéries d'origine animale.

Espèce	Souche type	Niche Ecologique	Référence
<i>Bifidobacterium animalis</i>	ATCC 25527 = DSM 20104	intestin rat, poule, lapin, veau	Mitsuoka, 1969
<i>Bifidobacterium asteroides</i>	ATCC 25910 = DSM 20089	abeille	Scardovi et Trovatelli, 1969
<i>Bifidobacterium boum</i>	ATCC 27917 = DSM 20432	Rumen de bovin, intestin porcelet	Scardovi <i>et al.</i> , 1979
<i>Bifidobacterium choerinum</i>	ATCC 27686 = DSM 20434	intestin porcelet	Scardovi <i>et al.</i> , 1979
<i>Bifidobacterium coryneforme</i>	ATCC 25911 = DSM 20216	abeille	Scardovi et Trovatelli, 1969 Biavati <i>et al.</i> , 1982
<i>Bifidobacterium cuniculi</i>	ATCC 27916 = DSM 20435	intestin lapin	Scardovi <i>et al.</i> , 1979
<i>Bifidobacterium gallinarum</i>	ATCC 33777 = DSM 20670	intestin (cæcum) poule	Watabe <i>et al.</i> , 1983
<i>Bifidobacterium indicum</i>	ATCC 25912 = DSM 20214	abeille	Scardovi et Trovatelli, 1969
<i>Bifidobacterium longum</i> , <i>biovar suis</i>	ATCC 27533 = DSM 20211	intestin porc	Mateuzzi <i>et al.</i> , 1971 Sakata <i>et al.</i> , 2002
<i>Bifidobacterium magnum</i>	ATCC 27540 = DSM 20222	intestin lapin	Scardovi et Zani, 1974
<i>Bifidobacterium merycicum</i>	ATCC 49391 = DSM 6492	rumen de bovin	Biavati et Matarelli, 1991
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> , <i>subsp. globosum</i>	ATCC 25865 = DSM 20092	intestin porcelet, poule, lapin, veau, rumen de bovin	Yaeshima <i>et al.</i> , 1992
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> , <i>subsp. pseudolongum</i>	ATCC 25526 = DSM 20099	intestin porcelet, poule, lapin, veau, rumen de bovin	Mitsuoka, 1969
<i>Bifidobacterium pullorum</i>	ATCC 27685 = DSM 20433	intestin poule	Trovatelli <i>et al.</i> , 1974
<i>Bifidobacterium ruminantium</i>	ATCC 49390 = DSM 6489	rumen de bovin	Biavati et Matarelli, 1991
<i>Bifidobacterium saeculare</i>	ATCC 49392 = DSM 6531	intestin de lapin	Biavati <i>et al.</i> , 1992
<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	ATCC 25525 = DSM 20210	rumen bovin, intestin porc, poule, veau	Mitsuoka <i>et al.</i> , 1969

Tableau G 5C. Espèces de bifidobactéries d'origine environnementale.

Espece	Souche type	Niche écologique	Références
<i>Bifidobacterium animalis</i> , subsp. <i>lactis</i>	DSM 10140	laits fermentés	Meile <i>et al.</i> , 1997; Klein, 1999.
<i>Bifidobacterium minimum</i>	ATCC 27538 = DSM 20102	eaux usées	Biavati <i>et al.</i> , 1982
<i>Bifidobacterium psychraerophilum</i>	ND*	ND*	Simpson <i>et al.</i> , 2003.
<i>Bifidobacterium subtile</i>	ATCC 27537 = DSM 20096	eaux usées	Biavati <i>et al.</i> , 1982
<i>Bifidobacterium thermacidophilum</i>	JCM 11165	eaux usées	Dong <i>et al.</i> 2000

* ND= non définie

phénotypique des bactéries anaérobies au niveau du genre. Toutefois, des critères s'appuyant sur l'analyse des molécules moins soumises aux variations, tels que l'ADN ou les ARN s'imposent.

Des amorces oligonucléotidiques et des sondes oligonucléotidiques spécifiques du genre *Bifidobacterium* ont été définies (Tableau G6, page 27) (Matsuki *et al.* 1998; 1999; Kaufmann *et al.*, 1995, Yamamoto *et al.* 1992). Ces outils permettent à la fois une identification rapide et sensible des membres du genre *Bifidobacterium* et une analyse quantitative des bifidobactéries (PCR en temps réel, FISH). Une distinction entre les bactéries vivantes et non- vivantes présentes dans un échantillon est actuellement possible par l'utilisation de l'ARNm (macromolécule à temps de vie très court) comme matrice dans les réaction d'amplification par PCR.

I. 5. 2. 2. Les espèces du genre *Bifidobacterium*

Le diagnostic de l'espèce repose sur des caractéristiques phénotypiques et moléculaires.

Les analyses taxonomiques basées sur les caractéristiques phénotypiques des bifidobactéries telles que la composition de la paroi cellulaire, l'analyse de la mobilité électrophorétique de diverses enzymes (F6PPK, transaldolase, 6-phosphogluconate deshydrogénase, β -galactosidases et leur différentes isoenzymes), ou encore le profil de fermentation de différents saccharides et les techniques de dénombrement sont des technique laborieuses et parfois peu fiables. En outre, l'expression de différents gènes (ou opérons) impliqués dans ces processus peut varier en fonction des conditions de culture.

L'alternative est offerte par la biologie moléculaire. Deux types de démarches faisant appel à la génétique moléculaire viennent actuellement compléter les informations apportées par les techniques de la systématique classique:

- des analyses prenant en compte le génome bactérien complet (génotypage)
- des analyses ciblées sur la séquence d'un gène (ou d'un opéron) à valeur taxonomique

I. 5. 2. 2. 1. Le génotypage

Deux types de techniques de taxonomie moléculaire sont basés sur l'analyse du génome bactérien complet: le profil d'hybridation des ADN-ADN et la présence des empreintes génomiques.

I. 5. 2. 2. 1. 1. Hybridation ADN-ADN

Par définition, 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'éluion thermique inférieure à 5°C (Wayne *et al.*, 1987, Bahaka *et al.* 1993). Ces travaux permettent de subdiviser une espèce en plusieurs souches ou de regrouper plusieurs espèces en une seule. Ainsi, l'espèce *B. adolescentis* (*sensu lato*) telle qu'elle a été décrite par Mitsuoka (1969) est désormais scindée en cinq espèces: *B. adolescentis* (*sensu stricto*), *B. angulatum*, *B. catenulatum*, *B. dentium* et *B. pseudocatenulatum* (Scardovi et Crociani, 1974; Scardovi *et al.*, 1979). Par contre, les espèces *B. thermophilum* et *B. ruminale* sont

Tableau G6. Séquence des amorces oligonucléotidiques utilisées pour le diagnostic taxonomique de genre, espèce et souche chez *Bifidobacterium* sp.

Appellation de l'amorce	Séquence de l'amorce (5'-3')	Taille de l'amplicon (pb)	Séquence d'ADN ciblée	Espèce de <i>Bifidobacterium</i> détectée	Références
338F	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	(338F/PO) 332	Fragment du gène codant pour l'ARN 16S chez les eubactéries	<i>Bifidobacterium</i> sp.	Ventura <i>et al.</i> , 2001 b.
PO	GAAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	(PO/P6)1350	Le gène codant pour l'ARN 16S	<i>Bifidobacterium</i> sp.	Ventura <i>et al.</i> , 2001a
P6	CTACGGCTACCTTGTACGA				
Lm3	CGGGTGCTNCCCACTTTCATG	(PO/Lm3) 1426	Le gène codant pour l'ARN 16S	<i>Bifidobacterium</i> sp.	Ventura <i>et al.</i> , 2001b
BiADO-1	CTCCAGTTGGATGCATGTC	279	Séquence partielle du gène codant pour l'ARN 16S	<i>B.adolescentis</i>	Matsuki <i>et al.</i> , 1998
BiADO-2	CGAAGGCTTGCTCCCAGT				
BiANG-1	CAGTCCATCGCATGGTGGT	275		<i>B. angulatum</i>	
BiANG-2	GAAGGCTTGCTCCCCCA				
BiBIF-1	CCACATGATCGCATGTGATTG	278		<i>B. bifidum</i>	
BiBIF-2	CCGAAGGCTTGCTCCCCAA				
BiBRE-1	CCGGATGCTCCATCACAC	288		<i>B. breve</i>	
BiBRe-2	ACAAAGTGCCTTGCTCCCT				
BiCATg-1	CGGATGCTCCGACTCCT	289		<i>B.catenulatum</i>	
BiCATg-2	CGAAGGCTTGCTCCCGAT				
BiLONg-1	TTCCAGTTGATCGCATGGTC	277	<i>B. longum</i>		
BiLONg-2	TCSCGCTTGCTCCCGAT				
ERIC-1	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC	Variable, caractéristique de la souche	ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus)	<i>B. animalis</i> et <i>B. animalis</i> biovar <i>lactis</i>	Ventura et Zink, 2002
ERIC-2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG				
16S	GCTAGTAATCGGGATCAG	Variable, caractéristique de la souche	ITC (Internally Transcribed Spacer)	<i>B. animalis</i>	Ventura et Zink, 2002
23Si	CATTCCGACACCCTGGGATC			<i>B. animalis</i> biovar <i>lactis</i>	

désormais réunies sous le nom de *B. thermophilum* (Zani *et al.*, 1974; Lauer et Kandler, 1983).

I. 5. 2. 2. 1. 2. Empreintes génomiques

Versalovic et collaborateurs (1991) ont constaté la présence de courtes séquences nucléotidiques répétitives (ERIC, ou Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) à valeur taxonomique chez plusieurs genres bactériens. Ces éléments répétitifs permettent, par leur structure et localisation, l'identification d'un microorganisme au niveau du genre, espèce et souche ainsi que le dénombrement des souches et espèces présentes dans un microécosystème (alimentaire ou environnemental). Il a été ainsi confirmé que *B. lactis* est une sous espèce de *B. animalis* (Tableau G6, page 27) (Ventura *et al.*, 2003).

Une autre technique permettant à la fois la détection des empreintes génomiques et l'identification de l'origine des différentes souches de bifidobactéries est la RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). La complexité de la méthode réside dans la définition de l'amorce oligonucléotidique, la qualité de l'ADN et la mise au point des conditions de PCR (Vincent *et al.*, 1998).

I. 5. 2. 2. 2. Autres techniques d'analyse. Le ribotypage

Kullen (1997), Requena (2002) et leur collaborateurs ont montré que les gènes codant pour une recombinase (*recA*) et pour une transaldolase peuvent servir comme critère (diagnostique) quant à la confirmation du genre bactérien. Par contre, ces séquences ne permettent que l'identification d'un nombre restreint d'espèces de *Bifidobacterium*. Une analyse plus fine qui cible la détection de l'espèce et des souches prennent actuellement en compte la structure de l'ARN ribosomal (ribotypage).

L'amplification en système monoplex ou multiplex (Mullié *et al.*, 2003) du gène codant pour l'ARN 16S suivie par l'analyse du profil de restriction (ARDRA ou Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) (Ventura *et al.*, 2001) constitue une technique rapide et sensible d'identification de différentes espèces de bifidobactéries, mais elle soulève encore des questions quand à la détection des espèces très proches phylogénétiquement (Tableau G6, page 27).

De ce point de vue il est estimé que l'analyse de l'ARN 23S ou encore de la séquence qui sépare les deux gènes (ITS ou Internally Transcribed Spacer) peut augmenter la spécificité des produits d'amplification. Les banques de données informatiques contiennent peu de séquences des gènes codant pour les ARN 23S. Par conséquent, Leblond-Bourget et collaborateurs (1996) ont proposé l'exploitation des séquences ITS 16S-23S. Ces séquences, plus abondantes dans les banques de données, seraient moins soumises à la pression évolutive qui a amené à la différenciation des espèces. Selon Ventura et Zink (2002), cette augmentation de la variabilité permet une différenciation fine des bifidobactéries au niveau des souches.

I. 6. Ecologie du genre Bifidobacterium

Les bifidobactéries ont été isolées à partir de trois niches écologiques: l'organisme humain, l'organisme animal et l'environnement (Tableaux G5A, 5B et 5C, pages 23, 24 et 25).

I. 6. 1. Niches écologiques des bifidobactéries

Chez les humains, les bifidobactéries se retrouvent majoritairement dans l'intestin (la partie distale de l'iléon et le colon). Cependant, ces microorganismes ont été identifiés dans le vagin et la cavité buccale (Tableau G5A, page 23).

Dans le règne animal, la présence des bifidobactéries a été constatée majoritairement dans le tube digestif des mammifères (Tableau G5B, page 24). La présence des bifidobactéries chez la souris est occasionnelle (Mitsuoka et Kaneuchi, 1977).

Cinq espèces de *Bifidobacterium* ont été détectées chez la volaille (*B. animalis*, *B. galinarum*, *B. pseudolongum*, *B. pullorum* et *B. thermophilum*) (Mitsuoka *et al.*, 1969; Trovatelli *et al.*, 1974; Watabe *et al.*, 1983; Yaeshima *et al.*, 1992).

Scardovi et Trovatelli (1969) et Biavatti et collaborateurs (1982) ont identifié trois espèces de *Bifidobacterium*, *B. asteroides*, *B. coryneforme* et *B. indicum* chez les abeilles (Sardovi et Trovatelli, 1969; Biavati *et al.*, 1982).

Trois espèces de bifidobactéries ont été isolées à partir des eaux usées: *B. minimum*, *B. subtile* et *B. thermacidophilum* (Tableau G5C, page 25) (Biavati *et al.*, 1982; Dong *et al.*, 2000).

Récemment, en 2003, Simpson et collaborateurs ont identifié par analyse du gène HSP60 une nouvelle espèce d'origine environnementale, *B. psychraerophilum* (Simpson *et al.*, 2003). La séquence partielle de ce gène (560 pb) a été soumise aux banques de données en septembre 2003 (DOI 10.1099/ijs.0.02667-0). Toutefois, comme dans le cas de *B. urinalis*, l'existence de cette espèce n'a pas encore été validée par ICSB (International Comitee of Systematic Bacteriology).

Dans ce sous chapitre seront réunies les informations portant sur la localisation, l'implantation et l'évolution de la flore bifidogène dans l'intestin humain.

I. 6. 2. La flore bifidogène chez l'Homme

Ce chapitre est structuré en deux parties. Dans un premier temps, des informations portant sur la localisation, la structure et le mode d'implantation de la flore du tractus digestif humain seront présentées. Puis, la structure et l'évolution de la flore bifidogène humaine seront analysées.

I. 6. 2. 1. Généralités sur la flore du tractus gastro-intestinal (TGI) humain

I. 6. 2. 1. 1. Localisation de la microflore dans TGI

Dans leur revue bibliographique sur le développement de la microflore du TGI chez les nouveaux-nés, Mackie et collaborateurs (1999) synthétisent les informations portant sur

la localisation et l'évolution de la flore gastro-intestinale humaine. Selon ces auteurs, les microorganismes présents dans le tractus digestif humain occupent des niches écologiques spécifiques. Chaque étage du tube digestif se caractérise par une population microbienne bien définie en termes de nombre de cellules bactériennes et d'espèces.

Ainsi, l'estomac et le duodénum constituent, en raison d'un pH très acide et d'un flux rapide des aliments, un environnement peu peuplé par les microorganismes (10^3 - 10^5 bactéries/ mL de contenu stomacal) (Berg, 1996; Gaskins, 1997 ; Mackie *et al.*, 1999).

Les caractéristiques physico-chimiques du segment iléal du TGI permettent le développement d'une microflore plus variée et plus abondante (10^8 cellules bactériennes/ mL de contenu intestinal). Le colon est considéré comme le site primaire de colonisation bactérienne du TGI en raison d'une motilité intestinale et d'un flux alimentaire réduits (10^{10} - 10^{11} bactéries/ mL de contenu de colon) (Mackie *et al.*, 1999).

Selon les mêmes auteurs, les bactéries intestinales peuvent occuper quatre microhabitats: la lumière intestinale; la couche superficielle de mucus qui couvre les cellules épithéliales du TGI, la couche profonde de mucus retrouvée au niveau des cryptes intestinales et la surface des cellules épithéliales mucosales.

Il en résulte que la distribution des population microbiennes au long du tractus digestif se réaliserait selon deux dimensions: une dimension longitudinale (un gradient croissant des bactéries de l'estomac vers le colon) et verticalement (de la lumière intestinale vers les cellules épithéliales).

I. 6. 2. 1. 2. Composition de la microflore du TGI

Il est actuellement estimé que les cellules bactériennes présentes dans le TGI sont dix fois plus nombreuses que les cellules somatiques de l'hôte (Berg, 1996 ; Gaskins, 1997). Toutefois, les informations portant sur la composition de la microflore peuplant le TGI (en termes de nombre des genres et des espèces bactériennes) varient selon les techniques de détection utilisées.

i) Techniques d'analyse de la composition de la microflore du TGI

Deux types d'approches sont actuellement utilisées dans l'étude de la composition de la microflore intestinale: des techniques classiques de dénombrement des cellules viables éliminées dans les fèces et des techniques de biologie moléculaire (Priebe *et al.*, 2002).

Les analyses classiques permettent d'estimer la composition de la flore fécale cultivable utilisant des milieux de culture plus ou moins sélectifs. Par contre, les techniques moléculaires ne tiennent pas compte des exigences physiologiques des bactéries présentes dans les fèces (exigences nutritionnelles, anaérobiose). Elles permettent la détection de toutes les espèces bactériennes (viables ou pas), précédemment décrites ou nouvelles. Ces techniques prennent en compte la séquence d'ADN 16S (FISH, séparation des amplicons de l'ADN 16S par DGGE ou par TGGE) et rendent possible une identification au niveau du règne, embranchement, classe, ordre, famille, genre et espèce bactérienne (Langendijk *et al.*, 1995; Muyzer et Smalla, 1998; Priebe *et al.*, 2002).

ii) Genres bactériens détectés dans le TGI humain

Une analyse comparative des genres bactériens détectés dans les fèces humain par les deux catégories de techniques est présentée dans le Tableau G7, page 32 (Priebe *et al.*, 2002). Deux situations sont mises en évidence.

Dans un premier cas, le nombre des bactéries appartenant à certains genres (*Bacillus*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus Eubacterium*) est surestimé lors des analyses des fèces par des techniques classiques de culture (Priebe *et al.*, 2002). Par exemple, par ces techniques, Hill (1995) détecte 10^{10} - 10^{11} bifidobactéries/g de fèces. Par contre, en utilisant des sondes oligonucléotidiques fluorescentes spécifiques du genre *Bifidobacterium*, Franks et collaborateurs (1998) ne détectent que 10^7 à 4×10^9 bifidobactéries dans les fèces des individus appartenant au même groupe d'âge que ceux cités dans l'étude de Hill.

Une deuxième situation est observée dans le cas des genres *Atopobium*, *Phascolarctobacterium* et *Ruminococcus* (Tableau G7, page 32) (Priebe *et al.*, 2002). Ces trois genres bactériens ne sont pas détectés par les techniques d'analyse classique. Par contre, les techniques moléculaires mettent en évidence un nombre de cellules de *Ruminococcus* sp. dix fois plus important par rapport aux bifidobactéries détectées de la même manière (Franks *et al.*, 1998).

En conclusion, il apparaît que le nombre des espèces microbiennes colonisant le TGI n'est pas encore parfaitement élucidé. Cependant, les informations actuelles situent les bifidobactéries parmi les microorganismes appartenant à la flore dominante autochtone du colon humain (Priebe *et al.*, 2002).

I. 6. 2. 1. 3. Cinétique de colonisation du TGI

I. 6. 2. 1. 3. 1. Acquisition de la flore intestinale par les nouveaux-nés

Plusieurs auteurs considèrent que, quelque soit le mode d'accouchement, la flore du tractus respiratoire et du tube digestif des nouveaux-nés est d'origine maternelle et environnementale. Ainsi, les équipes de Bettelheim (1974) et Brook (1979) ont constaté que les sérotypes d'*E. coli* isolées de la bouche de nouveaux nés se retrouvent dans la flore intestinale des mères. De même, le contenu gastrique des nouveau-nés dans les premières 5 à 10 minutes de vie est identique à la flore cervicale maternelle (Brook *et al.*, 1979). Tannok et collaborateurs (1992), qui ont analysé le profil plasmidique de trois groupes bactériens (bifidobactéries, lactobacilles et entérobactéries) isolés à la fois dans les fèces des nouveaux-nés et dans la flore fécale maternelle (Tannock *et al.*, 1992), confirment cette hypothèse.

Dans le cas des enfants nés par césarienne, ceux-ci viennent d'abord en contact avec les microorganismes présents dans l'environnement, puis avec la flore cutanée maternelle (Tannok, 1994).

I. 6. 2. 1. 3. 2. Evolution de la flore intestinale chez les nouveaux-nés

Dans ce sous chapitre seront présentées les informations décrivant les principales étapes de colonisation du TGI chez les nouveaux-nés, en rapport avec le type d'allaitement. Ainsi, Cooperstock et Zedd (1983) ont divisé le développement de la flore intestinale des nourrissons en quatre étapes (Cooperstock et Zedd 1983).

Tableau G7. Composition de la flore fécale humaine (selon Priebe *et al.*, 2002).

Caractéristiques physiologiques	Genre	Bactéries détectées par gramme de fèces	
		1	2
Bactéries anaérobies nonsporulantes	<i>Bacteroides</i>	10^{10} - 10^{11}	4×10^9 - 2×10^{10}
	<i>Bifidobacterium</i>	10^{10} - 10^{11}	$<10^7$ — 4×10^9
	<i>Atopobium</i>	ND*	8×10^8 - 10^{10}
	<i>Eubacterium</i>	10^9 - 10^{10}	3×10^8 - 8×10^9
	<i>Propionibacterium</i>	10^9 - 10^{11}	ND*
	<i>Veillonella</i>	10^5 - 10^8	$<10^7$ - 10^8
	<i>Ruminococcus</i>	ND*	2×10^8 - 10^{10}
	<i>Phascolarctobacterium</i>	ND*	10^7 - 7×10^8
Bactéries anaérobies sporulantes	<i>Clostridium</i>	10^5 - 10^9	10^7 - 2×10^8
Bactéries aérobies sporulantes	<i>Bacillus</i>	10^4 - 10^6	ND*
Bactéries microaérophiles	<i>Lactobacillus</i>	10^7 - 10^9	$<10^7$ - 3×10^7
	<i>Streptococcus</i>	10^7 - 10^9	$<10^7$ - 5×10^7
	<i>Enterococcus</i>	10^5 - 10^7	ND**
Bactéries anaérobies facultatives	Coliformes	10^7 - 10^9	$<10^7$ - 5×10^8
	Autres entérobactéries	10^5 - 10^9	

Les analyses ont été réalisées chez des adultes sains, par techniques de dénombrement sur milieux sélectifs (1) (Hill, 1995) et par hybridation avec des sondes oligonucléotidiques fluorescentes (FISH) (2) (Franks *et al.*, 1998; Harmsen *et al.*, 2002).

* ND= non détecté

La première étape, appelée phase d'acquisition initiale, correspond aux deux premières semaines de vie de l'enfant. Pendant la première semaine, les premiers colonisateurs sont les entérobactéries et les streptocoques et ceci quelque soit le mode d'allaitement (sein ou lait maternisé) (Stark *et al.*, 1982 ; Conway, 1997). Selon Stark et collaborateurs (1982), ces genres bactériens seraient responsables de la création d'un microenvironnement favorable à l'implantation ultérieure des genres anaérobies *Bacteroides*, *Bifidobacterium* et *Clostridium* (Stark *et al.*, 1982).

Bifidobacterium sp. et *Bacteroides* sp. sont détectés dans le TGI à partir du troisième jour et atteignent le maximum de population au sixième jour de vie des nouveaux-nés. Conway (1997) a constaté chez les enfants nourris au lait maternisé une implantation plus rapide de ces genres bactériens par rapport aux enfants nourris au sein. Deux hypothèses sont proposées: le lait maternel contiendrait soit des facteurs antibactériens qui ralentissent l'implantation des deux genres cités ci-dessus, soit des facteurs bifidogènes sécrétés après le cinquième jour de lactation (Conway, 1997; Kunz et Rudloff, 1993).

La deuxième étape couvre le reste de la période où le lait est la seule source d'alimentation de l'enfant (Cooperstock et Zedd 1983). Pendant cette étape, *Bifidobacterium* est le genre prédominant dans les fèces des nouveaux-nés, et le nombre des bifidobactéries n'est pas influencé par le mode d'allaitement. Par contre, la présence des membres des genres *Bacteroides*, *Clostridium*, *Streptococcus* ainsi que des entérobactéries est influencée par le type d'alimentation. Ces microorganismes seraient plus nombreux chez les enfants nourris au lait maternisé (Benno *et al.* 1984; Mervissen-Verhage *et al.*, 1987). Par contre, Tannock (1994), considère que seuls les membres du genre *Clostridium* peuvent constituer des marqueurs du type d'allaitement (Tannock, 1994). Selon cet auteur, le nombre des clostridies détectées chez les enfants allaités au sein est toujours inférieur par rapport à ceux nourris au lait maternisé.

Pendant la troisième et la quatrième étape (introduction des aliments solides en parallèle avec l'allaitement et le sevrage), les bifidobactéries ne sont plus le genre dominant dans les fèces de l'enfant (Stark, 1982 ; Cooperstock, 1983). Le nombre des coques à Gram positif (*Peptococcus* sp. et *Peptostreptococcus* sp.) augmente progressivement (Cooperstock, 1983). De plus, d'autres genres bactériens caractéristiques de la flore intestinale adulte (*Veillonella*, *Staphylococcus*, *Propionibacterium*, *Bacillus*, *Fusobacterium*) sont alors détectés dans les fèces (Conway, 1997).

I. 6. 2. 2. Structure et évolution de la flore bifidogène

Le nombre de genres bactériens implantés dans l'intestin présente peu de variations en fonction de l'âge, de l'état de santé et des habitudes nutritionnelles de l'individu (Conway, 1997). Toutefois, ces facteurs induisent des variations qualitatives et quantitatives au niveau des espèces et des souches dominantes du colon (Conway, 1997). Par exemple, chez les nourrissons, les trois espèces caractéristiques de la flore intestinale seraient *B. bifidum*, *B. breve* et *B. longum*.

Selon Yuhara (1983), Benno (1984) et leurs collaborateurs, *B. breve* est l'espèce prédominante de *Bifidobacterium* dans les fèces des nourrissons, quelque soit leur mode d'allaitement. Les mêmes auteurs ont constaté que les espèces *B. adolescentis*, *B. longum* et

B. bifidum sont présentes chez les enfants du même groupe d'âge, mais moins fréquemment.

Selon les études de Mitsuoka (1982), *B. longum* biovar *infantis* serait l'espèce dominante dans les fèces des nouveaux-nés nourris au sein, suivies de près par les espèces *B. longum* et *B. bifidum* (Mitsuoka, 1982; Mitsuoka et Kaneuchi, 1977).

Une troisième étude effectuée par Mevissen-Verhage et collaborateurs (1987) confirme la dominance numérique de *B. breve* dans les fèces des nourrissons, mais attribue cet effet au mode d'allaitement (au sein). Selon ces auteurs, les enfants nourris au lait maternisé auraient une flore bifidogène caractéristique de l'adulte, marquée par la prédominance numérique des espèces *B. longum* et *B. adolescentis* (Conway, 1997, Satokari *et al.*, 2001).

A l'âge adulte, *B. longum* et *B. adolescentis* sont le plus souvent détectés parmi les espèces dominantes de la flore bifidogène humaine (Reuter, 2001). Ainsi, pour analyser la composition de la flore bifidogène des adultes et des enfants, Reuter (2001) prélève des échantillons de plusieurs segments du TGI (bouche, estomac, caecum, colon). Il désigne ainsi quatre espèces comme typiques de l'intestin de l'enfant (*B. bifidum*, *B. longum* biovar. *infantis*, *B. breve* et *B. parvulorum*) et trois espèces caractéristiques de l'adulte (*B. adolescentis*, *B. longum*, et certaines souches de *B. bifidum*). Cet auteur constate aussi une diminution du nombre et de la diversité d'espèces de *Bifidobacterium* avec l'âge.

Cette dernière observation est confirmée par Hopkins et Macfarlane (2002). Lors de l'analyse de la composition de la flore fécale des personnes âgées en bon état de santé et lors des infections à *Clostridium difficile*. Ces auteurs ont constaté la présence de deux espèces caractéristiques de la flore bifidogène de ce groupe d'âge: *B. adolescentis* et *B. angulatum*. Les fèces des patients infectés par *Clostridium difficile* se caractériseraient par un nombre plus important de *Lactobacillus* sp. et *Clostridium* sp., et par une diminution du nombre de *Bacteroides*, *Prevotella* et *Bifidobacterium* sp.

Selon Beachey (1981), ces modifications de composition de la microflore intestinale seraient dues aux changements structuraux produits dans la muqueuse intestinale. Ainsi, l'adhérence des bactéries à la muqueuse intestinale serait un facteur déterminant dans la colonisation de certains segments du TGI. Cette hypothèse a été également étudiée par Ouwehand et collaborateurs (1999) qui ont analysé la capacité de quatre souches sauvages de *Bifidobacterium* à adhérer au mucus isolé de fèces humain. Ce mucus a été obtenu à partir de sujets sains appartenant à quatre groupes d'âge: nouveaux nés, nourrissons (âgés de 2 à six mois), adultes (25 à 52 ans) et personnes âgées (74 à 93 ans).

Dans un premier temps, les quatre types de mucus ont été analysés du point de vue de leur composition quantitative en glucides, protéines simples et glycoprotéines totales du mucus (mucines). Ces auteurs ont montré que la quantité de saccharides détectés dans le mucus des personnes âgées est 1,5 à deux fois inférieure aux taux de glucides détectés chez les trois autres groupes d'âges. De plus, la quantité de protéines totales détectée chez les enfants et les adultes est supérieure de 30% à celle des personnes âgées.

Les quatre souches de *Bifidobacterium* testées adhèrent moins bien au mucus isolé à partir de fèces de personnes âgées par rapport au mucus des adultes et des enfants. Ces auteurs concluent que ces modifications structurales du mucus, liées à l'âge des sujets, seraient responsables d'une diminution des capacités d'adhérence des bifidobactéries (Ouwehand *et al.*, 1999). Ce résultat expliquerait les observations faites en 1972 par

Mitsuoka et Hayakawa qui ont constaté que le nombre de bifidobactéries présentes dans les fèces humain diminuent avec l'âge.

I. 7. Métabolisme saccharidique du genre Bifidobacterium

Les molécules qui viennent en contact de la microflore colonique sont généralement des résidus alimentaires non digestibles par l'hôte (poly- et oligosaccharides d'origine végétale, oligosaccharides du lait) ou des débris cellulaires (renouvellement des structures épithéliales du tube digestif, mucines gastriques et intestinales). Ces structures peuvent servir à la fois de substrats nutritifs et de support d'adhérence pour les bactéries résidentes dans l'intestin.

Par conséquent, le maintien et la prédominance des bifidobactéries dans les étages inférieurs du tube digestif humain seraient liés à la capacité de ces microorganismes à s'attacher aux mucines intestinales et à dégrader des substrats saccharidiques complexes, souvent d'origine végétale.

Du point de vue métabolique, les bifidobactéries posséderaient trois avantages sélectifs par rapport aux autres microorganismes de la flore intestinale:

- la capacité à fragmenter des structures glucidiques complexes par synthèse et sécrétion de glycosidases extracellulaires;
- la capacité à transporter des mono- et oligosaccharides ainsi obtenus par des systèmes spécifiques de transport;
- la capacité à dégrader des structures saccharidiques par des glycosidases intracellulaires et par des enzymes spécifiques des voies cataboliques des monosaccharides.

Dans ce sous-chapitre, chacune de ces trois étapes sera présentée par rapport à trois types de substrats saccharidiques généralement présents dans l'intestin humain: les glycoconjugués (présents dans la structure des mucines et des glycolipides des entérocytes et des colonocytes), les poly- et oligosaccharides végétaux et les monosaccharides.

I. 7. 1. Dégradation des chaînes oligosaccharidiques des glycoconjugués

I. 7. 1. 1. Fermentation des mucines

I. 7. 1. 1. 1. Généralités

Les mucines sont des constituants majoritaires du mucus à qui ils confèrent leurs propriétés rhéologiques.

Les mucines sont formées d'un axe peptidique (l'apomucine) hérissée de plusieurs centaines de chaînes oligosaccharidiques diverses. Les chaînes oligosaccharidiques sont liées à l'axe peptidique de l'apomucine par une liaison O-glycosidique réalisée entre un résidu de N-acétylgalactosamine (GalNAc) et un résidu d'acide aminé hydroxylé (sérine ou thréonine). Néanmoins, quelques rares N-glycannes peuvent également être trouvés au niveau des mucines.

i) Les O-glycannes de type mucine

Dans la structure des O-glycannes des mucines on distingue trois régions qui correspondent aux différentes étapes du processus d'O-glycosylation : le noyau (initiation), le squelette (élongation) et la périphérie (fin de synthèse des glycannes) (Hounsell et Feizi, 1982 ; Hounsell *et al.*, 1996). Le noyau comprend le résidu de GalNAc substitué par un ou deux monosaccharides. Huit structures différentes ont été décrites jusqu'à présent (Tableau G8A, page 37). L'élongation des chaînes glycaniques de mucines peut se poursuivre par l'addition de résidus de galactose et de GlcNAc (Kabat *et al.*, 1982) (Figure G2A, page 38). La périphérie des O-glycannes est représentée par des saccharides (tels que l'acide sialique, le fucose, le galactose, la GalNAc) qui viennent se greffer sur le squelette sous l'action de différentes glycosyl transférases (Muchmore *et al.*, 1987 ; Gold et Shochat, 1989 ; Corfield *et al.*, 1993) (Figure G2B, page 38).

ii) Les N-glycannes

Les N-glycannes sont reliés à l'apomucine par une liaison réalisée entre la fonction semialdéhyde d'un résidu de GlcNAc et le groupement amide d'un résidu asparaginyll de l'axe peptidique. La structure commune à tous les N-glycannes est un noyau pentasaccharidique, le trimannosyl-di-N-acétylchitobiose (de Waard *et al.*, 1991).

I. 7. 1. 1. 2. Fermentation des mucines par les bifidobactéries

En 1977, Salyers et collaborateurs ont analysé la capacité de 22 espèces de bactéries normalement présentes dans le colon humain à fermenter différents substrats glucidiques complexes (Salyers *et al.*, 1977b). Ils ont constaté que *B. bifidum* est capable de dégrader les mucines gastriques de porc. En revanche, ce substrat n'était fermenté par aucune des dix espèces testées de *Bacteroides* originaires du colon humain (Salyers *et al.*, 1977, a). Plus tard, Crociani et collaborateurs (1994) ont montré que *B. bifidum* est le seul des 29 espèces (290 souches) de *Bifidobacterium* analysées capable de dégrader les mucines gastriques de porc (Crociani *et al.*, 1994). Selon ces auteurs, les mucines gastriques constitueraient un substrat fermentescible uniquement pour *B. bifidum*. Par contre, ces auteurs ne donnent aucune indication sur les systèmes enzymatiques impliqués dans ce processus.

Hoskins et collaborateurs (1985) considèrent également que les bactéries intestinales sont responsables de la dégradation des chaînes oligosaccharidiques des glycoprotéines des mucines intestinales. Selon ces auteurs, ce processus serait lié à la production par ces microorganismes de glycosidases extracellulaires constitutives (Hoskins *et al.*, 1981, 1985). Deux genres bactériens anaérobies, à paroi Gram positif sont analysés plus en détail par Hoskins et son équipe: *Bifidobacterium* et *Ruminococcus* (Hoskins *et al.*, 1985). Ce qui distinguerait ces bactéries des autres habitants du colon humain serait la production de neuraminidases et d'autres α -glycosidases reconnaissant les structures oligosaccharidiques spécifiques d'antigènes de groupe sanguin. De même, ces auteurs ont constaté la présence d'une activité β -galactosidase et β -N-acétylhexosaminidase chez ces deux genres bactériens. Ils associent ces activités enzymatiques avec la possibilité de dégradation des β -glycosides des chaînes oligosaccharidiques des glycoprotéines. Ces auteurs concluent que les deux espèces de *Bifidobacterium* analysées, *B. bifidum* VIII-210

Tableau G 8A. Structure des différents noyaux des O-glycannes.

Désignation	Structure	Localisation	Références
Noyau 1	Gal (β163)GalNAc	ubiquitaire	Carlson, 1968
Noyau 2	GlcNAc (β1-6)-GalNAc (β1-3) Gal	ubiquitaire	Lamblin <i>et al.</i> , 1984 Lamblin <i>et al.</i> , 1991
Noyau 3	GlcNAc (β163)-GalNAc	colon, méconium, liquide amniotique	Lamblin <i>et al.</i> , 1984 Lamblin <i>et al.</i> , 1991
Noyau 4	GlcNAc (β1-6)-GalNAc (β1-3) GlcNAc	mucines respiratoires, méconium	Lamblin <i>et al.</i> , 1984 Lamblin <i>et al.</i> , 1991
Noyau 5	GalNAc (α1-3)-GalNAc	carcinome rectal, méconium	Kourosaka <i>et al.</i> , 1983 Hounsell <i>et al.</i> , 1985.
Noyau 6	GlcNAc (β1-6)-GalNAc	liquide séminal, méconium, kyste ovarien	Schachter et Brockhausen, 1992
Noyau 7	GalNAc (α1-6)-GalNAc	mucines sous-maxillaires bovines	Chai <i>et al.</i> , 1992.
Noyau 8	Gal (α1-3) GalNAc	mucines respiratoires	van Halbek <i>et al.</i> , 1994

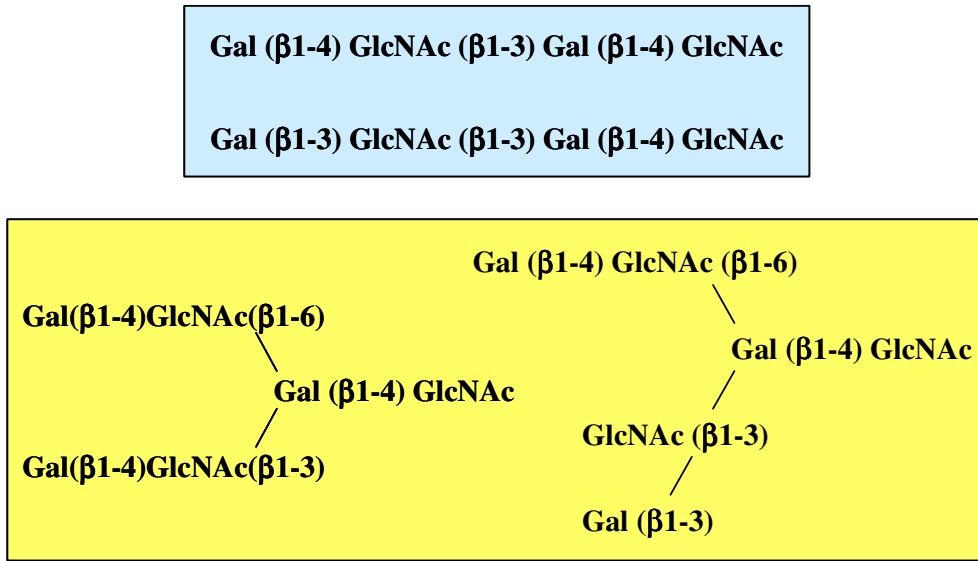


Figure G2A. Exemples de squelettes de chaînes glycaniques de mucines. Les différents squelettes possibles ségrèguent en deux classes: structures linéaires (en bleu) et structures branchées (en jaune).

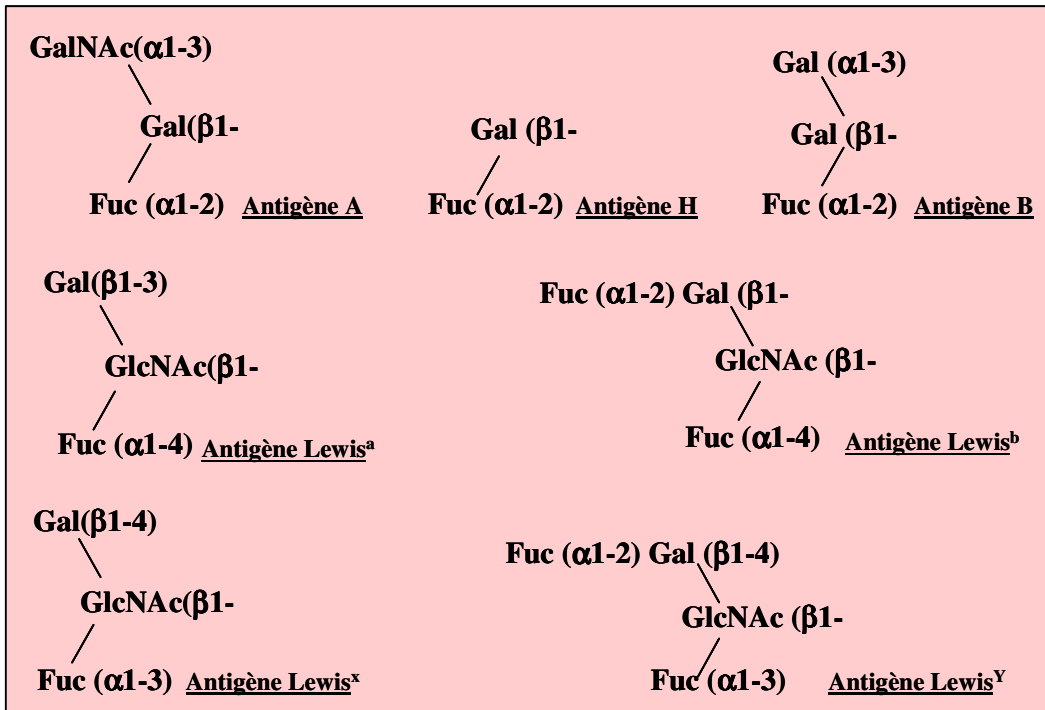


Figure G2B. Déterminants glycaniques présents à la périphérie des mucines

et *B. longum* biovar. *infantis* VIII-240 peuvent fermenter les oligosaccharides des mucines intestinales, à condition que ces enzymes soient sécrétées (Hoskins *et al.*, 1985).

En 1999, Derensy-Dron et collaborateurs confirment l'existence des enzymes (exoglycosidases et endoglycosidases) dégradant les mucines gastriques de porc chez *B. bifidum* DSM 20082. En incubant ces mucines avec l'extrait cellulaire de *B. bifidum* DSM 20082, ces auteurs ont constaté l'apparition de trois types de structures saccharidiques. Séparées par chromatographie en couche mince, ces molécules migrent comme des mono-, di- et trisaccharides. Une analyse par spectrométrie de résonance magnétique de ces saccharides à conduit aux structures suivantes:



et un trisaccharide sulfaté ou phosphorylé (Derensy-Dron *et al.*, 1999). Selon Derensy-Dron et ses collaborateurs, l' α -D-Gal-1-P observé est le produit de phosphorolyse d'une galactosyl-N-acétylhexosamine phosphorylase de *B. bifidum*. Cette enzyme semble agir sur les deux saccharides phosphorylés précédemment détectés. Après purification et caractérisation des paramètres enzymatiques, ces auteurs ont montré *in vitro* que cette protéine cytoplasmique catalyse aussi la réaction reverse, de transglycosylation.

Selon ces auteurs, chez *B. bifidum* DSM 20082, la plus grande proportion de galactose serait incorporé sous forme de disaccharides (Derensy-Dron *et al.*, 1999). L'enzyme galactosyl-N-acétylhexosamine phosphorylase devient ainsi responsable de la production majoritaire de Gal-1-P métabolisé ensuite par la voie de Leloir. De cette manière, le rôle de la glucokinase, une autre enzyme responsable de la production de Gal-1-P, diminuerait, ce qui permettrait à la cellule d'économiser l'ATP.

I. 7. 1. 2. Fermentation des glycosphingolipides

La capacité de deux espèces de *Bifidobacterium*, *B. bifidum* VIII-210 et *B. longum* biovar *infantis* VIII-240 à dégrader des glycosphingolipides d'origine intestinale a été analysée par Larson et collaborateurs (Tableau G8B, page 40) (Larson *et al.*, 1998).

Ces deux espèces ont été décrites précédemment par Hopkins et collaborateurs (1985) comme capables de fermenter les mucines intestinales. Les substrats glycolipidiques utilisés ont été isolés à partir des entérocytes humains et leur structure a été déterminée par spectrométrie de masse (Tableau G8B, page 40). Les produits obtenus lors de l'incubation de ces substrats en présence d'extrait cellulaire de *Bifidobacterium* sp. ont été identifiés par chromatographie en couche mince et par réaction immunologique avec des anticorps dirigés contre les antigènes spécifiques de groupe sanguin.

Ces auteurs ont pu constater que les glycosidases présentes dans l'extrait cellulaire des deux espèces de *Bifidobacterium* dégradent ces glycosphingolipides d'une manière séquentielle (Tableau G8B, page 40). Dans les deux cas, le produit final de dégradation est un lactosylcéramide. L'activité des enzymes responsable de la formation de ces produits de dégradation (intermédiaires et final) a été mesurée.

Les auteurs ont ainsi pu mettre en évidence une activité neuraminidase, deux types d'activité fucosidase, deux activités N-acétyl hexosaminidase différentes, et une activité β -galactosidase. Par exemple, cette étude démontre, pour la première fois, la présence chez

Tableau G 8B. Dégradation des glycosphingolipides par *Bifidobacterium* sp. *

Substrats	Symbole	Produits	Activités enzymatiques détectées
Galβ1→4Glcβ1→1Cer	Lac Cer	LacCer	-
NeuAcα2→3Galβ1→4Glcβ1→Cer	G _{M3}	LacOse ₄ Cer LacCer	α (2→3) neuraminidase
Galβ1→3GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glcβ1→1Cer 2 ↑ Fucα1	H-5	LcOse ₄ Cer LacCer	α (1→2) fucosidase β (1→3) galactosidase β (1→3) N-acétyl glucosaminidase
Galβ1→3GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glcβ1→1Cer 4 ↑ Fucα1	Le-5	LcOse ₄ Cer LcOse ₃ Cer LacCer	α(1→4) fucosidase β (1→3) galactosidase β (1→3) N-acétyl glucosaminidase
Galβ1→3GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glcβ1→1Cer 2 4 ↑ ↑ Fucα1 Fucα1	Le-6	Le-5 LcOse ₄ Cer LcOse ₃ Cer LacCer	α (1→2) fucosidase α (1→4) fucosidase β (1→3) galactosidase β (1→3) N-acétyl glucosaminidase
Galα1→3Galβ1→3GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glcβ1→1Cer 2 ↑ Fucα1	B-6	B5	α (1→2) fucosidase
GalNAcα1→3Galβ1→3GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glcβ1→1Cer 2 ↑ Fucα1	A-6	A5 H5 LacCer	α (1→2) fucosidase, α (1→3) N- acétyl hexosaminidase β (1→3) galactosidase

* Selon les données de Larson et collaborateurs (1988).

B. longum biovar. *infantis* d'une activité α -1 \rightarrow 2 fucosidase. Dans ce cas, cette enzyme permet de cliver un résidu de fucose d'une chaîne oligosaccharidique sans nécessiter le clivage préalable des résidus terminaux α GalNAc1 \rightarrow 3 ou α Gal1 \rightarrow 3 (Larson *et al.*, 1998). De même, les auteurs associent la formation rapide et en grande quantité de lactosylcéramide (LacCer) à partir du substrat A-6 avec une activité endo-N-acétyl- β -D-glucosaminidase. Ces deux exemples témoignent de l'existence d'endoglycosidases chez *Bifidobacterium* sp. Par contre, ces auteurs ne donnent aucune information sur les transformations métaboliques subies par les structures saccharidiques ainsi obtenues dans la cellule de *Bifidobacterium*.

I. 7. 2. Fermentation des polysaccharides et des oligosaccharides d'origine végétale

Van Laere et collaborateurs (2000) ont étudié six genres bactériens normalement présents dans le colon humain, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus*, *Eubacterium*, *Lactobacillus* et *Clostridium* du point de vue de leur habilité à fermenter cinq substrats polysaccharidiques d'origine végétale, ainsi que les oligosaccharides résultant de la fermentation de ces substrats. Ces auteurs ont constaté que parmi les quatre espèces de *Bifidobacterium* testées (*B. adolescentis*, *B. breve*, *B. longum* biovar. *infantis* et *B. longum*), seule *B. longum* était capable de fermenter complètement les arabinoxylyanes. Tout comme *B. breve* et *B. adolescentis*, cette espèce hydrolyse partiellement les arabinogalactanes et les arabinanes.

Degnan et Macfarlane ont étudié plus en détail l'utilisation d'un arabinogalactane par *B. longum*. Ces auteurs ont analysé la dégradation de ce polysaccharide en monoculture (*B. longum* seul) et en co-culture *B. longum*-*Bacteroides thetaiotaomicron*.

Dans les deux types de cultures, *B. longum* exprime toutes les enzymes nécessaires à l'hydrolyse de l'arabinogalactane (arabinogalactanase, α -arabinopyranosidase et β -galactosidase). De plus, la synthèse de ces enzymes est induite par le substrat (l'arabinogalactane) et réprimée par le glucose. En revanche, *B. longum* n'est pas capable de croître en présence d'arabinose comme seule source de carbone. Le rôle de l' α -arabinopyranosidase serait donc de fragmenter d'avantage le substrat polysaccharidique et favoriser l'accès à d'autres enzymes saccharolytiques (Degnan et Macfarlane, 1994).

Lorsque *B. longum* est cultivé avec *B. thetaiotaomicron*, le degré d'utilisation de ce polysaccharide, analysé par chromatographie de gel filtration, est plus élevé. Le profil d'élution indique une utilisation complémentaire par les deux espèces des oligosaccharides composant l'arabinogalactane.

Dans ce deuxième cas, le nombre de cellules de *B. longum* dépasse le nombre des bifidobactéries obtenues en monoculture. Ce qui indiquerait que les deux organismes agissent en synergie. En réalité, ce partenariat n'est observé qu'aux concentrations élevées en substrat. En effet, lorsque le même type de co-culture est réalisé en conditions limitantes en arabinogalactane, la population de *B. thetaiotaomicron* reste inférieure à celle observée lorsque cette espèce est cultivée seule.

Les auteurs concluent que, même si *B. longum* est dépendante de *B. thetaiotaomicron* pour obtenir plus de substrats saccharidiques métabolisables, il y a une compétition entre les deux bactéries pour le substrat. *B. longum* présente alors un avantage sélectif car il est capable de séquestrer des substrats mono- et oligosaccharidiques (Degnan et Macfarlane, 1994).

Van Laere et collaborateurs (2000) ont analysé par chromatographie d'échange d'anions à haute performance (HPAEC) le milieu de culture de quatre espèces de *Bifidobacterium*. Dans chacun des cas le milieu a été complété par différents oligosaccharides d'origine végétale. Ces auteurs ont constaté que ces espèces de bifidobactéries étaient capables de fermenter les (arabino) galactooligosaccharides, les arabinoooligosaccharides, les arabinoxyloligosaccharides, les xylooligosaccharides et les fructooligosaccharides obtenus par hydrolyse contrôlée de l'inuline. Par opposition, aucune des espèces analysées n'avaient pas utilisé les rhamno- et les galacturonooligosaccharides présents dans le milieu de culture. Les auteurs ont conclu de ce travail que les bifidobactéries utilisent préférentiellement les substrats oligosaccharidiques linéaires tels que les fructo- et les galactooligosaccharides.

Dans ce sous chapitre seront brièvement présentées les glycosidases caractérisées chez *Bifidobacterium* sp., responsables de la capacité de ce genre bactérien à dégrader des poly- et oligosaccharides (Tableaux G9A, G9B, G9C et G9D, pages 43, 44, 45 et 46) ou identifiées par voie bioinformatique (Tableau G10, page 47).

I. 7. 2. 1. Arabinofurane hydrolase (EC 3. 2. 1. 55)

L'utilisation des arabinoxylanes par *Bifidobacterium* sp. a été démontrée par Van Laere et son équipe (1997). Ces auteurs ont constaté la présence dans l'extrait cellulaire de *B. adolescentis* d'une enzyme capable de cliver les résidus terminaux d'arabinofuranose liés au C-3 de chaînes de xylopyranose doublement substitué. Cette enzyme a été purifiée et partiellement caractérisée (Tableau G9A, page 43). Elle agit uniquement sur les arabinoxylanoligosaccharides di-substitués et permet l'utilisation complète de ces substrats glucidiques par *B. adolescentis*.

I. 7. 2. 2. α -L-arabinofuranosidase

En 2003, Margolles et de los Reyes-Gavilán purifient et caractérisent une α -L-arabinofuranosidase recombinante de *B. longum* B667 (Tableau G9A, page 43). Cette exo-enzyme libère le L-arabinose lié en α -1,3- et en α -1,5- à partir de différents substrats oligosaccharidiques naturels (arabinane, arabinoxylane, arabinobiose, arabinotriose, arabinotétraose, arabinopentaose) et synthétiques (*p*-nitrophényl α -L-arabinofuranoside ou *p*NPaAra). Les auteurs relient la présence de cette enzyme chez *B. longum* avec la capacité de cette espèce à dégrader l'hémicellulose éventuellement présente dans l'alimentation (Margolles et de los Reyes-Gavilán, 2003).

I. 7. 2. 3. β -D-xylosidase (EC 3. 2. 1. 37)

Shin et collaborateurs (2003) ont isolé et caractérisé à partir de *B. breve* K-110 une β -D-xylosidase qui libère les résidus β -D-xylopyranose à partir des deux glycosides (ginsénoside Ra1 et ginsénoside Ra2) originaires de *Panax ginseng* (le grain de ginseng) (Shin *et al.*, 2003). L'enzyme hydrolyse aussi le xylane et le *p*-nitrophényl- β -D-

Tableau G 9A. Glycosidases caractérisées chez différentes espèces de *Bifidobacterium*.

Enzyme		Poids moléculaire (kDa)	Substrat(s)	pH _{opt}	T _{opt} (°C)	K _M (mM)	V _M (µmoles/min/mg)	Espèce	Références
α-L-arabinofuranosidase (AbfB)	ND	4 x 61	pNPαAra ₄ ; α-L-arabinofuranosides (arabinane, arabinoxylane, arabinobiose, arabinotriose, arabinotétraose, arabinopentaose);	6	45	0,295	417	<i>B. longum</i> B667	Margoles et de los Reyes-Gavilan, 2003
α-L-arabinofuran hydrolase (AXH-d3)	EC 3.2.1.55.	100	Arabinoxylan oligosaccharides (substitués en C-2 ou C-3 par un résidu d'arabinofuranose);	6	30	ND	ND	<i>B. adolescentis</i>	Van Laere <i>et al.</i> , 1997.
β-D-xylosidase	EC 3.2.1.37	49	A: pNP-β-X; B: ginsénoside Ra1; ginsénoside Ra2	5	37	A =1,54 B =5,56	A =121,8 B =5,56x 10 ³	<i>B. breve</i> K11	Shin <i>et al.</i> 2003
α-D-glucosidase (AglA)	EC 3.2.1.20.	ND	pNPαGlc; isomaltose; isomaltotriose, tréhalose;	6,6	37	1,05	228	<i>B. adolescentis</i> DSM 20083	Van den Broek <i>et al.</i> , 2003.
α-D-glucosidase (Agl B)	EC 3.2.1.20	ND	pNPαGlc; isomaltose; maltose, saccharose;	6,8	47	0,47	113	<i>B. adolescentis</i> DSM 20083	Van den Broek <i>et al.</i> , 2003.
β-D-glucosidase	EC 3.2.1.21.	47 à 48	A: pNPβGlc; B: pNPβFuc;	5,5	45	A = 1,3 B = 0,7	ND	<i>B. breve</i> 203	Nunoura <i>et al.</i> , 1996 a, b.
β-D-glucosidase	ND	110	A: Sénoside B; B: 4-MUG; pNPβGlc, amygdaline, salicine;	6	37	A =0,94 B =0,53	ND	<i>Bifidobacterium sp. SEN</i>	Yang <i>et al.</i> , 1996

Les optima de température et de pH ont été déterminés par rapport à la réaction d'hydrolyse. La constante de Michaelis (K_M) est calculée par rapport au substrat saccharidique (marqué en gras lorsque l'enzyme hydrolyse plusieurs substrats). La nomenclature des enzymes est celle précisée par les auteurs. Lorsque l'enzyme est multimérique, le nombre des homomères est indiqué et le poids moléculaire de la protéine est indiqué comme multiple (x) du poids moléculaire de chaque sous unité monomérique. ND=non déterminé.

Tableau 9B. Galactosidases caractérisées chez différentes espèces de *Bifidobacterium*.

Enzyme		Poids moléculaire (kDa)	Substrat(s)	pH _{opt}	T _{opt} (°C)	K _M (mM)	V _M (µmoles/min/mg)	Espèce	Références
α-D-galactosidase	EC 3.2.1.22.	4 x 79	A: pNPαGal B: raffinose	5,5	55	A=0,957 B= 4,12	ND	<i>B. adolescentis</i> DSM 20083	Ledler <i>et al.</i> , 1999.
α-D-galactosidase	EC 3.2.1.22.	4 x 83	mélibiose, raffinose, stachyose, verbascose;	6	45	ND	ND	<i>B. adolescentis</i> DSM 20083	Van Laere <i>et al.</i> , 1999.
β-D-galactosidase	EC 3.2.1.23.	163, 170, 178, 190	A: pNPGal; B: Lactose;	6,5	37	A= 2,2 B= 13	A= 3,04 B= 2,70	<i>B. bifidum</i>	Dumortier <i>et al.</i> , 1994.
β-D-galactosidase (LacZ)	ND	77,4	ND	ND	ND	ND	ND	<i>B. longum</i> MB219	Rossi <i>et al.</i> , 2000.
β-D-galactosidase (BIF1)	ND	6 x 112	oNPβGal	ND	ND	ND	ND	<i>B. bifidum</i> DSM 20215	Moller <i>et al.</i> , 2001.
β-D-galactosidase (BIF 2)	ND	2 x 117	oNPβGal	ND	ND	ND	ND	<i>B. bifidum</i> DSM 20215	Moller <i>et al.</i> , 2001
β-D-galactosidase (BIF3)	ND	188	oNPβGal	ND	ND	ND	ND	<i>B. bifidum</i> DSM 20215	Moller <i>et al.</i> , 2001
β-D-galactosidase (INF1)	ND	2 x 77	oNPβGal	ND	ND	ND	ND	<i>B. longum</i> biovar. <i>infantis</i> DSM 20088	Moller <i>et al.</i> , 2001

Les optima de température et de pH ont été déterminés par rapport à la réaction d'hydrolyse. La constante de Michaelis (K_M) est calculée par rapport au substrat saccharidique (marqué en gras lorsque l'enzyme hydrolyse plusieurs substrats). La nomenclature des enzymes est celle précisée par les auteurs. Lorsque l'enzyme est multimérique, le nombre des homomères est indiqué et le poids moléculaire de la protéine est indiqué comme multiple (x) du poids moléculaire de chaque sous unité monomérique. ND= non déterminé.

Tableau G 9C Galactosidases caractérisées chez différentes espèces de *Bifidobacterium*.

Enzyme		Poids moléculaire (kDa)	Substrat(s)	pH _{opt}	T _{opt} (°C)	K _M (mM)	V _M (µmoles/min/mg)	Espèce	Références
β-D-galactosidase I (β-Gal I)	ND	113	oNPβGal, lactose;	ND	ND	ND	ND	<i>B. longum</i> biovar. <i>infantis</i> HL 96	Hung <i>et al.</i> , 2001
β-D-galactosidase II (β-Gal II)	ND	4 x 115	A: oNPβGal; B: lactose;	7,5	50	A= 2,26 B= 73,8	A= 262x10 ³ B= 1,28x10 ³	<i>B. longum</i> biovar. <i>infantis</i> HL96	Hung et Lee, 2002
β-D-galactosidase II (β-Gal II)	ND	4 x 89	A: pNPβGal; B: β-D-Gal _p -(1-4)-D-Glc _p ; C: β-D-Gal _p -(1-4)- β-D-Gal _p -(1-4)-D-Glc _p ; D: β-D-Gal _p -(1-4)- β-D-Gal _p -(1-4) - β-D-Gal _p -(1-4)-D-Glc _p ; E: β-D-Gal _p -(1-4)-D-Gal _p ; F: β-D-Gal _p -(1-4)-β-D-Gal _p -(1-4)-D-Gal _p ; G: β-D-Gal _p -(1-4)-β-D-Gal _p -(1-4)-β-D-Gal _p -(1-4)-D-Gal _p ;	6	35	A= 2,2 ± 0,2 B= 0 C=2,2 ± 0,2 D= 4 ± 0,4 E= 3,7 ± 0,3 F= 6,4 ± 0,2 G= 5,2 ± 0,7	A= 5x10 ³ B= 0 C= 93x10 ³ D= 68x10 ³ E= 95x10 ³ F= 48,6x10 ³ G= 17x10 ³	<i>B. adolescentis</i> DSM 20083	Van Laere <i>et al.</i> , 2000.
β-D-galactosidase III (β-Gal III)	ND	76	oNPβGal, lactose;	ND	ND	ND	ND	<i>B. longum</i> biovar. <i>infantis</i> HL 96	Hung <i>et al.</i> , 2001

Les optima de température et de pH ont été déterminés par rapport à la réaction d'hydrolyse. La constante de Michaelis (K_M) est calculée par rapport au substrat saccharidique (marqué en gras lorsque l'enzyme hydrolyse plusieurs substrats). La nomenclature des enzymes est celle précisée par les auteurs. Lorsque l'enzyme est multimérique, le nombre des homomères est indiqué et le poids moléculaire de la protéine est indiqué comme multiple (x) du poids moléculaire de chaque sous unité monomérique. ND=non déterminé.

Tableau G 9D Glycosidases caractérisées chez différentes espèces de *Bifidobacterium*.

Enzyme		Poids moléculaire (kDa)	Substrat(s)	pH _{opt}	T _{opt} (°C)	K _M (mM)	V _M (µmoles/min/mg)	Espèce	Références
β-D-1,3-galactosyl-N-acétylhexosamine phosphorylase	EC2.4.1.52	140	β-D-Gal(1,3)-D-GlcNAc; β-D-Gal(1,3)-D-GalNAc;	6-6,5	50	4 ±0,7	403 x10 ³	<i>B. bifidum</i> DSM 20082.	Derensy-Dron <i>et al.</i> , 1999.
β-D-fructofuranosidase (BfrA)	EC3.2.1.26.	59,4	saccharose ; 1-kestose, rafitlose®, actilight®, inuline, raffinose;	7,6	37	10,3	31	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	Ehrmann <i>et al.</i> , 2003.
β-D-fructofuranosidase	ND	3 x 75	nystose, 1-kestose, saccharose, inuline, raffinose;	6-6,2	55	ND	ND	<i>B. longum</i> biovar <i>infantis</i>	Imamura <i>et al.</i> , 1994.
saccharose phosphorylase (ScrP)	ND	55,6	raffinose, saccharose, oligofructose;	ND	ND	ND	ND	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	Trinidad <i>et al.</i> , 2003.
N-acétyl-D-neuraminidase	ND	ND	NeuAc-α (2,3) – Lac; NeuAc-α (2, 8) – Lac;	ND	ND	ND	ND	<i>Bifidobacterium</i> sp.	Falk <i>et al.</i> , 1990; Von Nicolai <i>et al.</i> , 1981.
β-D-fucosidase	ND	47-48	A: pNPβGlc; B: pNPβFuc;	5,5	45	A =1,3 B =0,7	ND	<i>B. breve</i> 203	Nunoura <i>et al.</i> , 1996.

Les optima de température et de pH ont été déterminés par rapport à la réaction d'hydrolyse. La constante de Michaelis (K_M) est calculée par rapport au substrat saccharidique (marqué en gras lorsque l'enzyme hydrolyse plusieurs substrats). La nomenclature des enzymes est celle précisée par les auteurs. Lorsque l'enzyme est multimérique, le nombre des homomères est indiqué et le poids moléculaire de la protéine est indiqué comme multiple (x) du poids moléculaire de chaque sous unité monomérique. ND=non déterminé.

Tableau G10. Glycosidases putatives révélées par analyse bioinformatique de la séquence génomique de *B. longum* NCC 27045 (selon les données communiquées sur le réseau informatique, <http://gib.genes.nig.ac.jp>).

Gène	Localisation chromosomique	Protéine putative	Nombre de résidus (acides aminés)
ND	BL 0181	possible α -arabinofuranosidase I	824
ND	BL 0184	protéine présentant à l'extrémité C-terminale une séquence peptidique homologue avec une α -arabinofuranosidase II	711
ND	BL0187	exo- α -L-arabinofuranosidase II	345
<i>abf A2</i>	Bl 1166	α - arabinofuranosidase	567
ND	BL 1138	protéine similaire à l' α -L- arabinofuranosidase A	770
ND	BL 0182	possible endo-1,5- α -L- arabinosidase	582
ND	BL 0183	possible endo-1,5- α -L- arabinosidase	532
<i>abf A1</i>	BL 0544	α - L- arabinosidase	516
<i>abf A3</i>	BL 1611	α - L- arabinosidase	523
<i>xyn D</i>	BL 1543	endo- β -1,4-D- xylanase	843
<i>xyn F</i>	BL 1544	possible exo- xylanase extracellulaire	959
ND	BL 0523	possible xylosidase ou glycosidase	694
ND	BL 1334	probable pentosidase ou hexosidase	881
ND	BL 1327	α - mannosidase	1040
ND	BL 1328	α - mannosidase	1047
ND	BL 1329	α - mannosidase	1035
<i>agl A</i>	BL 0529	probable α -(1,4)- glucosidase; activité de type maltase	605
<i>agl</i>	BL 1526	oligo- 1,6- glucosidase	607
ND	BL 0388	possible glycanase ou glycogénase avec un domaine amylase	747
ND	BL 0907	probable cyclomaltodextrinase ou néopullulanase	466
ND	BL 0542	α - glucosidase (fragment)	336
ND	BL 1761	probable β -1,3- exoglucanase	405
<i>bglX</i>	BL 1757	possible β - glucosidase	788
<i>bglB</i>	BL 1763	possible β - glucosidase B	380
ND	BL 1764	β - glucosidase (fragment)	142
ND	BL 1077	β - glucuronidase (fragment)	35
<i>aga</i>	BL 1538	α - galactosidase	769
ND	BL 0177	possible α - galactosidase	470
<i>bgaB</i>	BL 0259	β - galactosidase I	711
<i>bga</i>	BL 1168	β - galactosidase I	692
<i>lac Z</i>	BL 0978	β - galactosidase	1024
ND	BL 1765	β - galactosidase (fragment)	201
ND	BL 0975	β - galactosidase (fragment)	16
yvf O	BL 0257	possible arabinogalactan endo- β -galactosidase ou galactanase	898
ND	BL 1335	probable endo- β - N-acétyl glucosaminidase ou di-N- acétylchitobiosyl β -N- acétyl glucosaminidase	938
ND	BL 1031	probable β - hexosaminidase	401
<i>cscA</i>	BL 0105	β -fructofuranosidase (sucrase/ invertase); possible inulinase	519
<i>spl</i>	BL 0536	sucrose phosphorylase	509

ND= non déterminé.

xylopyranoside (*p*NPbXyl) et constitue, à ce jour, la seule xylosidase de *Bifidobacterium* sp. caractérisée.

I. 7. 2. 4. α -glucosidases (EC 3. 2. 1. 20)

Deux α -glucosidases ont été mises en évidence chez *B. adolescentis* DSM 20083 par van den Broek et collaborateurs (Tableau G9A, page 43) (van den Broek *et al.*, 2003).

Ces enzymes, produites en système hétérologue chez *E. coli*, sont appelées AglA (EC 3.2.1.20) et AglB (EC 3.2.1.21) et présentent une faible spécificité de substrat. Les deux enzymes libèrent de l' α -glucose à partir de *p*-nitrophényl α -glucoside (*p*NP α Glc). L'AglA présente une plus haute affinité pour les saccharides possédant des liaisons en α -1,6- (isomaltose, isomaltotriose). L'AglB peut hydrolyser l'isomaltose (liaisons en α -1,6-), le maltotriose, le maltose, le maltitol (liaisons en α -1,4), le saccharose (liaison en α -Glc-1,2-*p* β Fru) et le mélizitose (liaisons en α -Glc-1,3-*p* β Fru). Les deux enzymes présentent *in vitro* une activité transglycosylase.

I. 7. 2. 5. β -glucosidases (EC 3. 2. 1. 21)

Nunoura et collaborateurs (1996) ont purifié à partir de l'extrait cellulaire de *B. breve* clb une β -D-glucosidase (EC 3.2.1.21) monomérique qui présente une activité hydrolase (β -glucosidase et β -fucosidase) ainsi qu'une activité transférase (à partir des résidus β -fucosyl) (Nunoura *et al.*, 1996 a). Plus tard dans la même année, les mêmes auteurs ont localisé, cloné et surexprimé le gène codant pour cette protéine (Nunoura *et al.*, 1996 b). Selon ces auteurs, la protéine recombinante a les mêmes propriétés enzymatiques que la protéine native isolée de chez *B. breve* clb.

Une deuxième β -glucosidase a été purifiée par Yang et collaborateurs (1996) à partir d'une souche sauvage de *Bifidobacterium* sp. d'origine intestinale humaine. Cette enzyme manifeste une activité hydrolytique envers les sennosides, le 4- méthylumbelliféryl- β -galactoside (MUG) et le *p*NPG. Les propriétés enzymatiques de ces deux β -glucosidases sont présentées dans le Tableau G9A, page 43.

I. 7. 2. 6. α -galactosidases (EC 3.2.1.22)

En 1999, Leder et collaborateurs purifient à partir de l'extrait cellulaire de *B. adolescentis* DSM 20083 une α -galactosidase tétramérique qui hydrolyse spécifiquement les liaisons α -1,3- galactosidiques et, avec une moindre affinité, les liaisons α -1,4 et α -1,6 glycosidiques. Cette protéine est analysée par la suite par Van Laere et collaborateurs (1999) pour une éventuelle activité transglycosidase. Utilisant cette enzyme, ces auteurs ont synthétisé *in vitro* deux prébiotiques, du raffinose et du saccharose à partir du mélibiose.

I. 7. 2. 7. β -D-galactosidases (EC 3. 2. 1. 23)

Trois types de β -D-galactosidases ont été décrites chez *B. bifidum* DSM 20082 et chez *B. longum* biovar. *infantis* (Dumortier *et al.*, 1994; Moller *et al.*, 2001; Hung et Lee, 2002). Ces enzymes, appelées BIF1, BIF2 et BIF3 (chez *B. bifidum*) ou β -Gal I, β -Gal II et β -Gal III (chez *B. longum* biovar. *infantis*) hydrolysent deux substrats : le lactose et

l'oNPGal (Tableau G9B, page 44). Seule la β -galactosidase isolée par Van Laere et collaborateurs (2000) chez *B. adolescentis* DSM 20083 utilise comme substrats d'hydrolyse des di-, tri- et tétragalactooligosaccharides.

Toutes ces enzymes présentent une activité transgalactosidasique (Dumortier *et al.*, 1994; Van Laere *et al.*, 2000).

I. 7. 2. 8. β -D-fructofuranosidases

Dans leur étude sur les différentes inulinases d'origine microbienne, Vandamme et Derycke (1983) démontrent qu'une hydrolase peut être considérée comme étant une β -D-fructofuranosidase si le rapport entre les activités saccharose hydrolase et inuline hydrolase de l'enzyme est inférieur à 50. Selon les mêmes auteurs, pour qu'une hydrolase soit une invertase, ce rapport doit être supérieur à 1600 (Vandamme et Derycke, 1983). Dans cette optique, on peut considérer que chez *Bifidobacterium* sp. trois enzymes à activité β -D-fructofuranosidase ont été caractérisées jusqu'à ce jour (Muramatsu *et al.*, 1992; Imamura *et al.*, 1994; Warchol *et al.*, 2002; Ehrmann *et al.*, 2003).

En 1994, Imamura et collaborateurs ont purifié, à partir de l'extrait cellulaire de *B. longum* biovar. *infantis* une protéine homotrimérique (3x75 kDa) qui hydrolyse plusieurs polymères de fructose: le nystose (100% d'affinité), le 1-kestose (81%), l'inuline (38%), le saccharose (27%) et le raffinose (1%) (Imamura *et al.*, 1994).

En 2002, une autre β -fructofuranosidase est purifiée à partir de *B. longum* biovar. *infantis* ATCC 15697 par Warchol et collaborateurs. Selon ces auteurs, l'enzyme est une exoinuline qui possède aussi les activités β -D-fructofuranosidase et invertase.

Ehrmann et collaborateurs (2003) ont identifié et cloné le gène *bfrA* codant pour une β -D-fructofuranosidase cytoplasmique (EC 3.2.1.26) chez *B. animalis* biovar. *lactis* DSM 10140. Ces auteurs ont exprimé ce gène en système hétérologue chez *E. coli*. La protéine recombinante est une exoenzyme qui hydrolyse le saccharose (100% d'affinité), le 1-kestose (91%), l'inuline (37%) et le raffinose (4%). Ces auteurs comparent cette nouvelle β -D-fructofuranosidase aux enzymes homologues caractérisées chez deux autres espèces. Ils constatent que les trois enzymes diffèrent non seulement par leur poids moléculaire, mais surtout par leur l'affinité envers différents polymères de fructose (Figure G3, page 50).

I. 7. 2. 9. Saccharose-phosphorylase

Récemment, Trinidad et collaborateurs (2003) ont identifié chez *B. animalis* biovar. *lactis* une structure génétique de type opéron apparemment impliquée dans le transport et la dégradation du saccharose. Selon ces auteurs, cet opéron serait constitué de trois gènes: un gène codant pour une saccharose phosphorylase (*scrP*), un régulateur (*scrR*) de la famille GalR-LacI et un gène codant pour un transporteur du saccharose (*scrT*). Chez *B. animalis* biovar. *lactis* l'activité saccharase est induite par la présence du saccharose, du raffinose et de l'oligofructose dans le milieu et réprimée par le glucose.

On peut ainsi conclure que les bifidobactéries possèdent de nombreuses glycosidases capables de dégrader différentes structures glucidiques afin de produire de l'énergie ou former des macromolécules nécessaires à leur croissance.

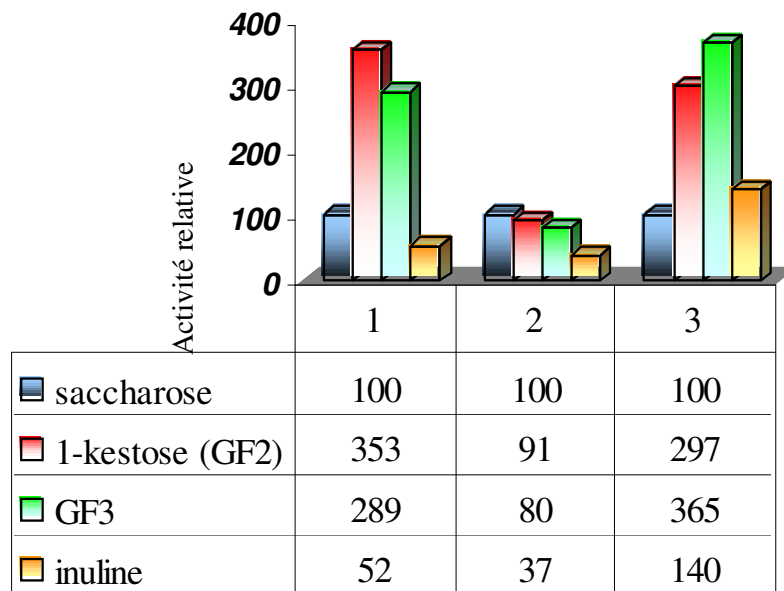


Figure G3. Analyse comparative des activités glycosidasiques relatives de l'extrait cellulaire de trois espèces de *Bifidobacterium*.

- 1) *B. adolescentis*
- 2) *B. animalis* biovar. *lactis*
- 3) *B. longum* biovar. *infantis*.

Les substrats saccharidiques analysés sont: le saccharose, le 1-kestose (GF₂), le nistose (GF₃) et l'inuline (selon les données d'Ehrman *et al.*, 2003).

Dans la suite de ce chapitre seront présentés les éléments les plus caractéristiques portant sur l'incorporation et le catabolisme des monosaccharides chez différentes espèces appartenant au genre *Bifidobacterium*.

I. 7. 3. Métabolisme des monosaccharides

I. 7. 3. 1. Transport membranaire des monosaccharides

Trois mécanismes différents de transport transmembranaire des saccharides ont été mis en évidence chez *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082 par Krzewinski et ses collaborateurs (Krzewinski, 1997).

i) symport à cation

Le glucose pénètre dans la cellule de *B. bifidum* par un système de symport à cation. Le potassium participerait au cotransport. En étudiant le transport des autres sucres en présence de glucose, l'auteur ne remarque pas de phénomène de répression comme c'est le cas chez de nombreuses bactéries.

Le transport du lactose se réalise chez *Bifidobacterium bifidum* par un mécanisme similaire à celui décrit chez *E. coli*, un symport à proton (F. Krzewinski, 1997). Par contre, cette espèce de *Bifidobacterium* présenterait un système de régulation différent à celui décrit chez *E. coli*. Le lactose pénètre à l'intérieur de la cellule bactérienne 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.

Le fructose est transporté au travers de la membrane par un symport à proton (F. Krzewinski). L'incorporation du fructose se réalise avec une vitesse constante, quelque soit le deuxième saccharide ajouté dans le milieu de culture. Par contre, il augmente le transport membranaire de nombreux autres saccharides. Cet effet synergique n'a pas pu être, pour le moment, expliqué.

ii) diffusion facilitée et translocation

Le transport du galactose chez *Bifidobacterium bifidum* dépendrait d'un mécanisme de diffusion facilitée et de la translocation du lactose (F. Krzewinski, 1997). Le galactose, une fois la membrane traversée, est très lentement phosphorylé par une galactokinase. Il y a peu de transformation de cette molécule par la suite.

iii) transport de la N-acétylglucosamine

Il existe trois hypothèses portant sur le transport de la N-acétylglucosamine dans la cellule des bifidobactéries (F. Krzewinski):

- la N-acétylglucosamine pénétrerait par une translocation de groupe. Cette hypothèse est soutenue par le fait que le fluorure de sodium (NaF) et la N-acétylglucosamine phosphorylée inhibent ce transport; par contre, le phosphoénol pyruvate exerce un effet inverse;

- une pénétration par un symport à cation;

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

I. 7. 3. 2. Dégradation des monosaccharides

I. 7. 3. 2. 1. Analyse de la capacité de sept espèces de *Bifidobacterium* à fermenter différents monosaccharides

Sept espèces de bifidobactéries (*Bifidobacterium angulatum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium globosum*, *Bifidobacterium longum* et *Bifidobacterium pseudolongum*) ont été étudiées de manière à identifier leur capacité à dégrader différents substrats saccharidiques : des monosaccharides (le glucose, le galactose, différents pentoses), un disaccharide (le maltose) et deux polysaccharides d'origine végétale (le raffinose et l'amidon) (Degnan *et* Macfarlane, 1991; Marounek *et al.*, 1998).

Il a été constaté que le glucose était utilisé d'une manière préférentielle par *B. bifidum* et *B. catenulatum*.

Le galactose était le substrat préféré pour *B. pseudolongum*.

Chez *B. angulatum* le glucose et le galactose étaient utilisés simultanément. Le même résultat a été obtenu vis-à-vis de l'utilisation du glucose et du xylose par *B. longum*.

L'espèce *B. breve* ne pouvait pas croître si l'arabinose était la seule source de carbone présente dans le milieu, mais la fermentation de ce monosaccharide augmentait en présence de glucose.

B. globosum était capable de fermenter le glucose, le galactose, différents pentoses, le maltose, le raffinose et l'amidon. Les acides produits lors de la fermentation de ces glucides présentaient des variations qualitatives et quantitatives en fonction du substrat saccharidique utilisé. Par exemple, lors de la fermentation du glucose il y avait plus de production d'acide formique et d'éthanol et moins de lactate par rapport au cas où le substrat fermentescible était l'amidon.

A partir de cette étude, il apparaît que le glucose serait un monosaccharide fermentescible par toutes les espèces analysées. De plus, sa présence dans le milieu de culture favoriserait, probablement au niveau du transport transmembranaire, l'utilisation d'autres substrats glucidiques.

I. 7. 3. 2. 2. Voies métaboliques de dégradation des saccharides chez *Bifidobacterium* sp.

I. 7. 3. 2. 2. 1. Introduction

Après hydrolyse des structures saccharidiques par différentes glycosidases bactériennes, les monosaccharides libérés seront dégradés dans la cellule pour assurer le développement et la croissance bactérienne. Il est actuellement généralement accepté que le produit intermédiaire clé du métabolisme saccharidique chez les bactéries est le

pyruvate (Doelle, 1969). En effet, afin d'intégrer différentes voies de biosynthèse ou de catabolisme, la plupart des monosaccharides sont d'abord convertis en pyruvate.

Selon les différentes réactions enzymatiques qui permettent la dégradation du glucose en acide pyruvique, quatre voies cataboliques sont décrites chez les bactéries :

- la glycolyse [ou la voie Embden-Meyerhof-Parnas (EMP)] ;
- la voie des hexose monophosphates (HMP, ou la voie Warburg-Dickens) ;
- la voie Entner-Doudoroff (ED) ;
- la voie de la phosphocétolase.

Chez *Bifidobacterium* sp., l'absence d'activités glucose-6-phosphate déshydrogénase (E.C. 1.1.1.49) et aldolase (E.C. 4.1.2.13) rend non fonctionnelles ces trois premières voies cataboliques (EMP, HMP et ED) (De Vries *et* Stouthamer, 1967). Par conséquent, chez les bifidobactéries, le glucose est fermenté exclusivement par la voie de la fructose-6-phosphate phosphocétolase (F6PPK) qui en est l'enzyme clé (Scardovi *et* Trovatelli, 1965; De Vries *et al.*, 1967) (Figure G4, page 54).

I. 7. 3. 2. 2. La voie de la F6PPK (le "shunt bifide")

La succession de réactions enzymatiques permettant la transformation du glucose en acide pyruvique par la voie de la F6PPK est décrite dans la Figure G4, page 54.

La première réaction de la voie de la F6PPK est la phosphorylation du glucose en G6P par une hexokinase (EC 2.7.1.1). Cette réaction nécessite la présence d'une molécule d'ATP et des ions Mg^{2+} (cofacteurs de l'hexokinase). Le G6P ainsi formé est ensuite isomérisé en F6P par l'enzyme glucose-6-phosphate isomérase (PGI, EC 5.3.1.9). Les réactions conduisant au F6P sont donc identiques à celles de la glycolyse.

Le F6P est ensuite clivé en érythrose-4 phosphate et acétyl phosphate par l'enzyme fructose-6-phosphate phosphocétolase (EC 4.1.2.22). Par ailleurs, les bifidobactéries possèdent une activité phosphofructokinase (de Vries, 1967). Il apparaît donc que le F1,6P, qui est un intermédiaire non métabolisable chez les bifidobactéries (à cause de l'absence d'activité F1,6P aldolase), serait un indicateur du taux de saturation de la voie de la F6PPK.

L'acétyl phosphate est ensuite déphosphorylé par l'enzyme acétate kinase (EC 2.7.2.1) conduisant à l'acide acétique et à l'ATP.

L'enzyme transaldolase (EC 2.2.1.2) catalyse la réaction de condensation aldolique de l'érythrose-4-P et d'une deuxième molécule de F6P. Le sédoheptulose-7-P et la glyceraldéhyde-3-P ainsi obtenus participent ensuite à une réaction de condensation cétylique catalysée par l'enzyme transcétolase (EC 2.2.1.1). Les produits de cette réaction sont le xylulose-5-P et le ribose-5-P. Il apparaît donc que la transaldolase et la transcétolase fonctionnent en sens inverse par rapport à la voie des HMP.

Le ribose-5-P est converti en xylulose-5-P *via* le ribulose -5-P, par les enzymes ribose-5-P épimérase (EC 5.3.1.6) et ribulose-5-P-3-épimérase (EC 5.1.3.1).

Le produit de cette séquence de réactions enzymatiques, le xylulose-5-P est ensuite clivé en acétyl phosphate et glyceraldéhyde-3-P (GA3P) par l'enzyme xylulose-5-phosphate phosphocétolase (EC 4.1.2.9). Le GA3P est transformé en lactate par une succession de réactions enzymatiques identiques à la glycolyse (Doelle, 1969).

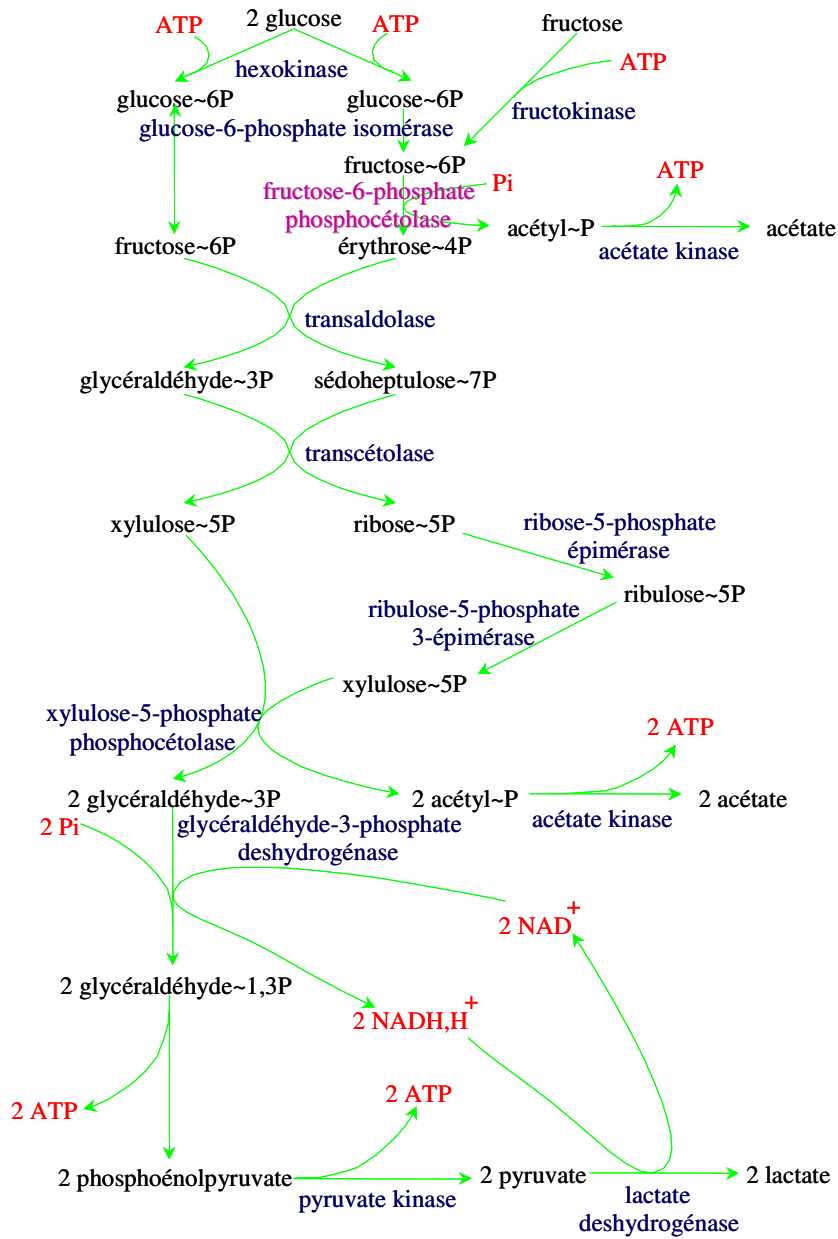


Figure G4. Voie de dégradation des hexoses chez les bifidobactéries (le "shunt bifide").

Les produits finaux de la dégradation du glucose varient selon la voie de transformation du pyruvate :

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

- toutefois, il a été observé que le pyruvate n'est pas toujours converti en lactate, mais en formiate, acétate et éthanol. Le pyruvate subit ainsi une décarboxylation pour donner deux molécules d'acétyl Coenzyme A et une molécule de formiate *via* la voie thioclastique (Doelle, 1969). Ensuite, les deux molécules d'acétyl Coenzyme A sont converties en acétate par l'acétate kinase en libérant une molécule d'ATP ou une molécule d'éthanol par l'action d'une déshydrogénase. A partir de deux moles de pyruvate, cette voie de conversion permet la formation de deux moles de formiate, une mole d'acétate et une mole d'éthanol (De Vries *et* Stouthamer, 1968; Lauer *et* Kandler, 1976). 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).

I. 7. 3. 2. 2. 3. Autres voies de dégradation des saccharides

Chez les bifidobactéries, deux autres voies métaboliques ont également été décrites : la voie de Leloir et la voie de la pyrophosphorylase. Ces voies permettent la dégradation du galactose avec le même bilan réactionnel.

Lors de la première étape, commune aux deux voies, le galactose est phosphorylé par la galactokinase de manière à être piégé dans la cellule bactérienne. Cet intermédiaire métabolique est ensuite converti en glucose-1-phosphate de deux façons différentes :

- la voie de Leloir convertit le galactose-1-phosphate en glucose-1-phosphate *via* l'UDP glucose hexose-1-phosphate uridylyltransférase en présence d'UDP glucose,

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

Le glucose-1-phosphate ainsi formé est par la suite isomérisé en un intermédiaire du "shunt bifide", le glucose-6-phosphate, par une phosphoglucomutase.

I. 7. 3. 2. 2. 4. Conclusion

On peut conclure que la voie de la F6PPK est la seule à permettre la fermentation des monosaccharides, neutres ou acides, chez les bifidobactéries. La F6PPK est l'enzyme clé de cette voie de dégradation. En effet, tous les hexoses doivent être préalablement transformés en fructose-6-phosphate, le substrat de la F6PPK, afin d'être métabolisés. Les produits finaux du "shunt bifide" présentent des variations qualitatives et quantitatives au sein de la même espèce en fonction du milieu de culture et de l'âge de la culture.

I. 7. 4. Régulation du métabolisme glucidique. La répression catabolique

La cellule bactérienne dispose de mécanismes de contrôle spécifiques lui permettant de réaliser une utilisation séquentielle, hiérarchique, des différentes sources de carbone présentes dans le milieu de culture (phénomène appelé répression catabolique). Dans cette partie seront d'abord brièvement présentées les informations portant sur la régulation du catabolisme glucidique chez les bactéries. Puis, les études réalisées sur la régulation du métabolisme saccharidique chez les bifidobactéries seront exposées.

I. 7. 4. 1. Généralités

Chez les bactéries, la régulation du métabolisme saccharidique se réalise, selon Bruckner et Titgemeyer (2002), à deux niveaux:

- au niveau transcriptionnel, par induction ou répression de l'expression des gènes et opérons impliqués dans le catabolisme des glucides;
- au niveau posttraductionnel, par inhibition, souvent de manière allostérique, des enzymes responsable du transport et dégradation des monosaccharides.

Le contrôle génétique de la biosynthèse des protéines impliquées dans le métabolisme saccharidique des bactéries peut se réaliser de deux manières, globale et spécifique (Bruckner et Titgemeyer).

I. 7. 4. 1. 1. Contrôle global de la transcription

Ainsi, un contrôle global de l'expression des gènes impliqués dans le catabolisme glucidique est réalisé par des régulateurs pléiotropiques tels que les protéines CAP (catabolite gene activator protein, chez les entérobactéries) ou son équivalent, la protéine CcpA (catabolite contrôle protein, chez les bactéries à Gram positif à faible pourcentage en GC). Chez *E. coli*, le complexe formé entre la protéine CAP et son activateur allostérique, l'AMP_c, est responsable de l'activation de plus de 100 promoteurs, dont plusieurs responsables de l'expression des gènes cataboliques (Busby et Ebright, 1999). Par conséquent, ces processus sont dépendants du taux intracellulaire d'AMP_c, donc de l'activité de l'adénylate cyclase. Chez les bactéries à Gram positif à faible pourcentage en GC, telles que *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus xylosus* et *Lactobacillus pentosus*, le complexe formé par la protéine CcpA et son co-répresseur, la protéine P-Ser-HPr, agit comme répresseur transcriptionnel (Romeo, 1998; Moreno *et al.*, 2001; Egeter et Bruckner, 1996). Ce complexe se fixe sur les séquences opératrices de type *cre* (catabolite responsive element) et diminue l'expression des gènes impliqués dans différentes étapes du catabolisme saccharidique. Contrairement à CAP, la protéine CcpA agit donc, dans la majorité des cas, comme un répresseur transcriptionnel.

I. 7. 4. 1. 2. Contrôle spécifique de la transcription

Les monosaccharides présents dans la cellule peuvent induire de manière spécifique l'expression des gènes impliqués dans leur catabolisme (Figures G5 et G6, pages 57 et 58) (Bruckner et Titgemeyer, 2002).

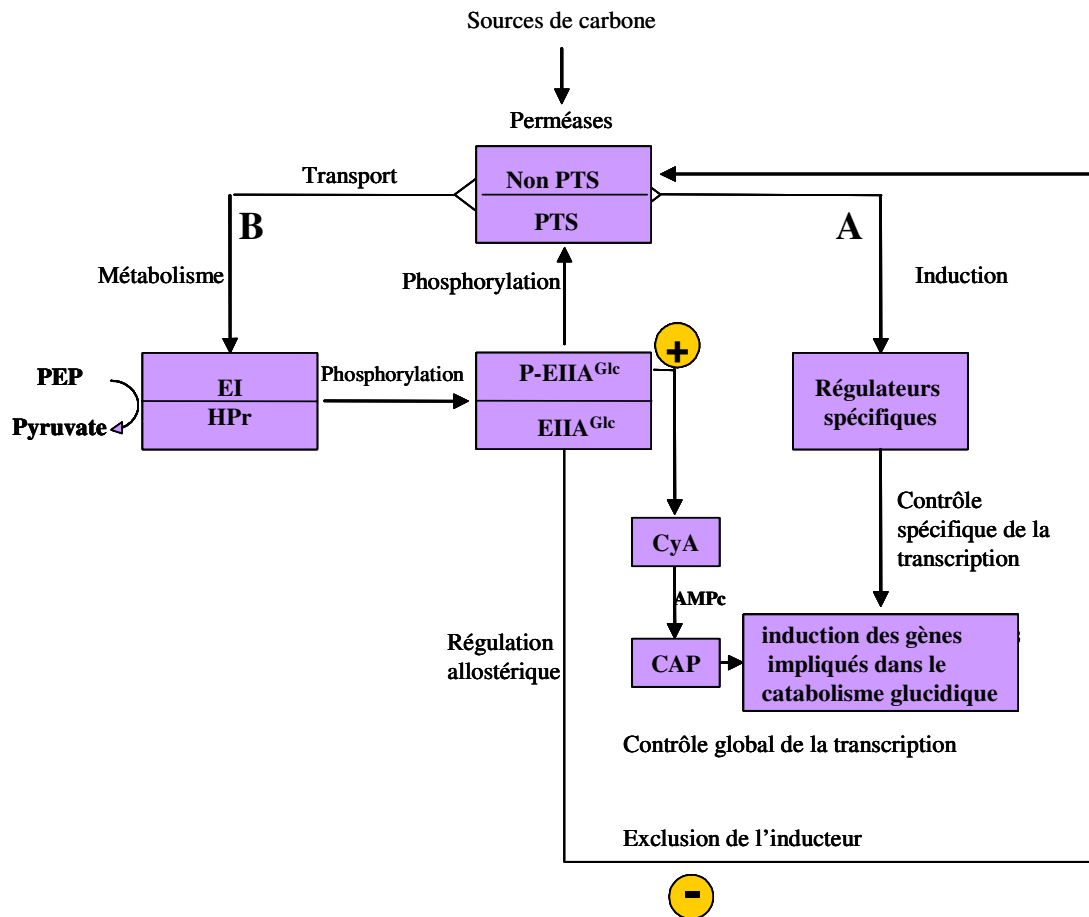


Figure G5. Représentation schématique des mécanismes impliqués dans la répression catabolique chez les bactéries à Gram négatif (selon Bruckner et Titgemeyer, 2002).

- (A) Les monosaccharides présents dans la cellule agissent, comme inducteurs, sur l'expression des gènes ou opérons impliqués dans leur dégradation (contrôle spécifique de la transcription).
- (B) Lors du catabolisme des saccharides il y a production de PEP (phosphoenol pyruvate). Le rapport PEP/pyruvate influence l'état de phosphorylation de la protéine EIIA^{Glc}, donc l'utilisation (+) ou non (-) des autres sources de carbone présentes dans l'environnement. L'enzyme EIIA^{Glc} non phosphorylée inhibe, par régulation allostérique, l'activité des perméases responsables du transport des glucides, autres que le glucose (phénomène appelé exclusion de l'inducteur). Lorsque le PEP est en excès, l'enzyme EIIA^{Glc} se retrouve en état phosphorylé. Sous cette forme, elle stimule l'activité de l'adénylate cyclase (CyA). L'AMP_c est un effecteur positif pour la protéine CAP (Catabolic Activating Protein). Le couple AMP_c-CAP est responsable du contrôle de l'expression de plusieurs gènes et opérons impliqués dans les processus cataboliques.

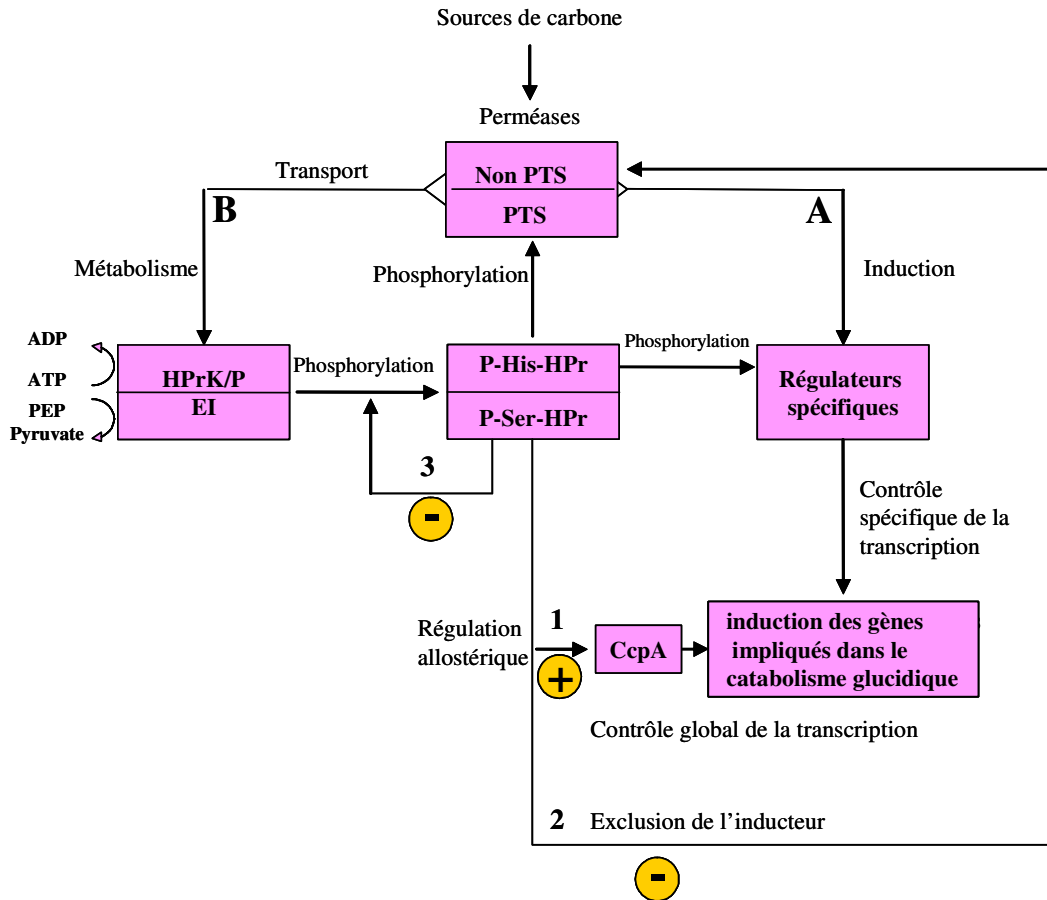


Figure G6. Représentation schématique des mécanismes impliqués dans la répression catabolique chez les bactéries à Gram positif à faible pourcentage en GC (selon Bruckner et Titgemeyer, 2002). (A) Les monosaccharides présents dans la cellule agissent, comme inducteurs, sur l'expression des gènes ou opérons impliqués dans leur dégradation (contrôle spécifique de la transcription). (B) Lors du catabolisme des saccharides il y a production de PEP (phosphoenol pyruvate) et d'ATP. La protéine HPr peut subir deux types de phosphorylation: a) un transfert du résidu gamma phosphate de l'ATP au résidu Ser₄₆ de l'HPR, catalysé par une HPr kinase (HPrK). b) un transfert d'un résidu phosphate du PEP au résidu His, catalysé par l'enzyme EI. L'enzyme HPrK/P peut exercer aussi une activité phosphatase (HPrP), lorsque les concentrations cellulaires en ATP sont élevées. Le rapport entre les deux types d'activité (HPrK/P) influence l'état de phosphorylation de la protéine HPr. La présence dans la cellule de la protéine HPr(Ser₄₆)-P a trois conséquences au niveau de la régulation de l'expression génétique: (1) activation des mécanismes de contrôle global de la transcription par la protéine CcpA (Catabolite control protein A), donc induction (+) des gènes et opérons impliqués dans différents processus cataboliques. (2) inhibition du transport transmembranaire des monosaccharides (dits non PTS), par inhibition (-) de l'activité des perméases (exclusion de l'inducteur). (3) inhibition (-) par feedback du transport des résidus phosphate de l'enzyme EI au résidu His de la protéine HPr, conduisant à l'interruption du transport des saccharides par le système de la phosphotransférase.

Au niveau posttranscriptionnel, les mécanismes responsables de la répression catabolique visent à limiter soit la présence du saccharide inducteur dans la cellule (par exclusion ou expulsion de l'inducteur), soit la dégradation intracellulaire par inhibition allostérique des enzymes impliquées dans son catabolisme (Figures G5 et G6, pages 57 et 58) (Bruckner et Titgemeyer, 2002).

Par exemple, le phénomène d'exclusion de l'inducteur a été décrit pour la première fois chez *E. coli* (Postma *et al.*, 1993). Chez cet organisme, selon l'état de phosphorylation de la protéine EIIA^{Glc} il y a catabolisme du glucose (P-EIIA^{Glc}) ou exclusion des autres monosaccharides inducteurs des systèmes permettant leur dégradation (Figure G6, page 58) (Postma *et al.*, 1993).

Nous décrivons plus en détail le phénomène d'exclusion de l'inducteur pour deux genres bactériens à Gram positif. Ainsi, chez *Lactococcus lactis* et *Lactobacillus casei*, la molécule responsable de ce phénomène est la protéine HPr du système de la phosphotransférase (Dossonnet *et al.*, 2000; Mondero *et al.*, 2001). Il a été démontré que HPr peut être phosphorylée de deux manières différentes. Lorsque le donneur de résidus phosphoryle est le PEP (le phosphoénol pyruvate), la réaction de phosphorylation est catalysée par la protéine EI. Cette enzyme transfère le résidu phosphate du PEP sur un résidu His de la protéine HPr (His-HPr). Par contre, lorsque le donneur est l'ATP, la réaction de phosphotransfert est catalysée par une HPrKinase/phosphatase (HPrK/P) qui conduit à une HPr phosphorylée sur un résidu Ser₄₆ (P-Ser-HPr). Cette molécule inhibe l'utilisation des monosaccharides, autres que le glucose, de deux manières. Elle peut inhiber de manière allostérique l'activité des perméases responsables du transport de ces monosaccharides (Figure G6, page 58). P-Ser-HPr inhibe également par un mécanisme de feedback la conversion du HPr en P-His-HPr (Dossonnet *et al.*, 2000; Mondero *et al.*, 2001).

Saier et collaborateurs (1996), ont observé que l'addition dans le milieu de culture d'un monosaccharide facilement métabolisable par les bactéries est accompagné par une expulsion des autres glucides présents dans la cellule (Saier *et al.*, 1996). Chez *Lactobacillus casei* et *Lactococcus lactis*, ce phénomène n'a pas pu être relié avec les différentes formes phosphorylées de la protéine HPr (Dossonnet *et al.*, 2000; Mondero *et al.*, 2001).

Postma (1993), Reizer (1998) et collaborateurs ont décrit trois situations où l'activité des enzymes associées au catabolisme glucidique est modulée de façon allostérique. Chez *E. coli*, l'activité de l'adénylate cyclase (CyA) est contrôlée de manière allostérique par l'enzyme EIIA^{Glc}-P du système de la phosphotransférase (Figure G5, page 57) (Postma *et al.*, 1993). Chez le même organisme, la forme non phosphorylée de l'enzyme (EIIA^{Glc}) agit comme un inhibiteur allostérique des perméases (Postma *et al.*, 1993). Chez *Bacillus subtilis*, le fructose-1,6-diphosphate constitue un inhibiteur allostérique de la glycérol kinase (Reizer *et al.*, 1998).

Un mécanisme différent a été observé chez les bactéries à Gram positif à haut pourcentage en GC (*Streptomyces* sp.). Ces organismes utilisent un système de la phosphotransférase pour le transport de plusieurs monosaccharides (glucose, fructose, mannose etc) (Parche *et al.*, 2000). Toutefois, contrairement aux résultats précédemment présentés, la protéine HPr n'est pas directement impliquée dans la répression catabolique

chez *Streptomyces* sp. (Nothaft *et al.*, 2003). Selon Angell et collaborateurs (1994), une autre protéine, appelée GlkA semble être impliquée dans le contrôle global de la transcription chez *Streptomyces* sp. (Angell *et al.*, 1994). GlkA est une protéine de la famille ROK (repressors, open reading frames, kinases) qui, à par son activité glucose kinase exerce aussi une activité régulatrice. Ainsi, Angell et collaborateurs (1994), ont observé qu'une souche de *S. coelicolor* déficiente en GlkA est incapable de moduler le métabolisme saccharidique par les mécanismes de la répression catabolique. Le même résultat est observé après complémentation de *S. coelicolor* par une glucokinase bactérienne (Angell *et al.*, 1994). L'implication d'une glucokinase dans la répression catabolique a également été observée chez d'autres bactéries à Gram positif, telles que *Staphylococcus xylosus* et *Bacillus megaterium* (Wagner *et al.*, 1995; 2000). Dans aucun des cas présenté le mécanisme d'action de la protéine GlkA sur le processus génétique et biochimique associés à la répression catabolique n'a été élucidé.

I. 7. 4. 2. Régulation du métabolisme saccharidique chez *Bifidobacterium* sp.

Dans leur analyse bioinformatique de la séquence chromosomique de *B. longum* NCC2705, Schell et collaborateurs (2002) ont observé que ce microorganisme utilise préférentiellement la régulation négative de l'expression génétique. Ces auteurs considèrent que ce type de régulation serait une modalité rapide et flexible d'adaptation de l'expression des gènes en réponse aux disponibilités nutritionnelles de l'environnement (Schell *et al.*, 2002).

Une analyse du contexte génétique du gène *scrP* effectuée par Trindade et collaborateurs montre l'existence d'un opéron saccharose chez *B. lactis*. Cet opéron serait constitué du gène *scrP*, d'un gène codant pour un régulateur de type GalR-LacI (gène *scrR*) et d'un troisième gène codant pour un transporteur putatif du saccharose (*scrT*). De même que pour *scrP*, l'expression des gènes *scrR* et *scrT* est induite par le saccharose et réprimée par le glucose (Trindade *et al.*, 2002).

A l'heure actuelle, une seule étude prend donc en compte l'aspect de la régulation de l'expression génétique chez *Bifidobacterium* sp. en fonction de la source de carbone présente dans le milieu. Trindade et collaborateurs (2003) ont dosé en parallèle le taux d'ARN_m codant pour une saccharose phosphorylase (ScrP) et l'activité saccharose phosphorylase des cellules de *B. lactis* cultivées en milieu minimum contenant une seule source de carbone. Ces auteurs ont constaté un facteur six d'induction de l'expression du gène *scrP* en présence de saccharose par rapport au glucose. Un facteur quatre d'induction a été observé lors d'une culture de *B. lactis* en milieu contenant un mélange équimoléculaire de saccharose et glucose. Ces auteurs ont considéré que l'expression du gène *scrP* est induite par le saccharose et réprimée par le glucose (Trindade *et al.*, 2003).

II. Principales caractéristiques des fructokinases bactériennes

II. 1. Introduction

Les microorganismes ont besoin pour proliférer de trouver dans leur environnement une source de carbone et d'azote. Les principales sources de carbone utilisées sont les saccharides. En effet, ceux-ci sont rapidement assimilés par les bactéries. Cette utilisation des saccharides par les microorganismes a amené de nombreux chercheurs à caractériser leurs voies de dégradation.

Dans la grande majorité des cas, ils ont pu constater un schéma général d'assimilation des saccharides dont la porte d'entrée est un monosaccharide. Les bactéries doivent donc hydrolyser les oligosaccharides afin de récupérer les résidus composant ces structures. Cette hydrolyse s'effectue soit au niveau intracellulaire pour les oligosaccharides ayant un degré de polymérisation inférieur à 5 et au niveau extracellulaire pour le reste. Les microorganismes semblent donc avoir développé un arsenal enzymatique et des transporteurs afin de pouvoir survivre dans des conditions défavorables.

Dans ce chapitre seront présentées les principales caractéristiques biochimiques des fructokinases bactériennes.

II. 2. Définition

La fructokinase ou encore l'ATP : D- fructose-6-phosphotransférase (E.C. 2.7.1.4) fait partie de la classe des transférases et de la sous classe des phosphotransférases. Chez les microorganismes, elle catalyse le transfert du phosphate γ de l'ATP sur la fonction hydroxyle du carbone C-6 du fructose et nécessite la présence des cations divalents (Mg^{2+}) comme cofacteurs.

II. 3. Analyse bioinformatique

Du point de vue de l'homologie de séquence en acides aminés, les 12 fructokinases bactériennes et eucaryotes caractérisées jusqu'à ce jour se divisent en deux grandes familles: la famille ROK et la famille PfkB (www.expasy.ch). Chacune de ces familles est composée de kinases qui possèdent un motif peptidique caractéristique.

II. 3. 1. La famille ROK (Repressors, Open Readin Frames, Kinases)

Les membres de la famille ROK sont des protéines qui exercent soit une activité kinase (fructokinases- ScrK, glucokinases -GlcK, allo-kinases- AlsK) soit une activité régulatrice (répresseurs de l'opéron xylose- XylR). La caractéristique structurale commune de ces molécules est la présence au niveau de l'extrémité N-terminale d'une séquence peptidique de 27 acides aminés riche en résidus de glycine (Figure G7, page 62).

Une analyse bioinformatique de la séquence en acides aminés des protéines ROK met en évidence une homologie de séquence plus importante dans la sous famille glucokinases (44% d'identité) par rapport aux fructokinases (33% d'identité).

ALSK_ECOLI/139-166	LgtGMGfAVwmngapwtGahgvaGelGH
GLK_BACSU/137-164	LgtGVGgGIiangeilhGingagGeiGH
GLK_STAXY/140-167	LgtGLGgGIisngeivhGhngsgAeiGH
GLK_STRCO/130-157	LgtGLGgGIiignklrrGhfgvaAefGH
NAGC_ECOLI/220-247	VhrGTGaGIisngrifiGrngnvGeiGH
SCRK_BACSU/128-153	IgtGIGaGAivegrllqGls..hPemGH
SCRK_PEDPE/129-154	IgtGVGaGVisqnhifnGrt..hTelGH
SCRK_ZYMMO/140-165	VgtGFgGVLidgkpihGla..hPemGH
XYLR_ANATH/213-240	VgiGLGaGIiidnklfrGaagfaGevGH
XYLR_BACSU/213-240	IstGIGiGVinnhlyrGvsqfsGemGH
XYLR_CALSR /213-240	VgiGIGaGIVigeevyrGakgfaGevGH
XYLR_LACPE/215-242	IhrGIGaGIildkhlfrGkqgeaGevGR
XYLR_STAXY/210-237	IhkGIGaGIiinkklyrGsngeaGeiGK

Figure G7. Alignement de signature protéique de différentes enzymes de la famille ROK. Les acides aminés conservés sont marqués en rouge (100% d'identité) et en bleu ($\geq 75\%$). Les enzymes alignées sont:

ALSK_ECOLI (putative allose-kinase chez *Escherichia coli*);
 GLK_BACSU (putative glucokinase chez *Bacillus subtilis*);
 GLK_STAXY (glucokinase chez *Staphylococcus xylosus*);
 GLK_STRCO (glucokinase chez *Streptomyces coelicolor*);
 NAGC_ECOLI (répresseur de l'opéron N-acétyl glucosamine chez *Escherichia coli*);
 SCRK_BACSU (fructokinase putative chez *Bacillus subtilis*);
 SCRK_PEDPE (fructokinase chez *Pediococcus penthosaceus*);
 SCRK_ZYMMO (fructokinase chez *Zymomonas mobilis*);
 XYLR_ANATH (répresseur putatif du xylose chez *Anaerocellum thermophilum*);
 XYLR_BACSU (répresseur du xylose chez *Bacillus subtilis*);
 XYLR_CALSR (répresseur du xylose chez *Caldicellulosiruptor* sp.);
 XYLR_LACPE (répresseur de l'opéron xylose chez *Lactobacillus penthosus*);
 XYLR_STAXY (répresseur de l'opéron xylose chez *Staphylococcus xylosus*).

Le maximum d'hétérogénéité est observé à l'intérieur du groupe des protéines XylR (29% d'identité), bien que tous ses membres soient isolés à partir de bactéries à Gram + (*Firmicutes*). On constate ainsi que cette sous famille se divise en deux classes :

- la première est la classe des protéines XylR identifiées chez *Lactobacillus pentosus* et *Staphylococcus xylosus*. En effet, ces protéines possèdent 19 acides aminés identiques sur les 27 alignés (soit 70% d'identité), alors que l'identité globale calculée par rapport aux 12 membres de la famille ROK n'est que de 15%.

- la deuxième classe réunit les répresseurs xylose de *Bacillus subtilis*, *Caldicellulodisruptor* sp. et *Anaerocellum thermophilum*. Selon le même alignement de séquence, ces protéines possèdent 44% d'acides aminés identiques. L'identité de séquence par rapport aux autres membres de la famille ROK est supérieure à 30%. Les protéines de cette classe seraient donc plus proches des gluco- et fructokinases de type ROK.

II. 3. 2. La famille PfkB

La caractéristique des protéines de la famille PfkB est la présence d'une signature peptidique à chaque extrémité de la séquence en acides aminés. Toutes les enzymes de cette classe possèdent une activité phosphotransférasique. Le résidu phosphorylé fourni par l'ATP est transféré soit sur un saccharide (ribose, fructose, inositol) soit sur un saccharide phosphorylé (fructose-1 (ou 6)-phosphate, tagatose-6- phosphate), soit encore sur le résidu 5'-OH d'un nucléoside (adénosine, inosine, guanosine).

La famille PfkB ségrège elle aussi en deux sous familles selon la position du motif peptidique conservé.

Ainsi, la sous famille PfkBI réunit des kinases qui possèdent une séquence peptidique spécifique de 25 acides aminés, localisée en N-terminal. Ce motif est constitué notamment de résidus glycine (G), mais aussi d'asparagine (N) et d'alanine (A) localisés à des emplacements définis (Figure G8, page 64). Quatre de ces acides aminés (G₂, N₆, G₁₅ et G₂₅) sont conservés à 100% chez toutes les protéines PfkB analysées.

Une très haute homologie de séquence a été constatée pour la sous- classe des fructokinases PfkBI (64% d'identité de séquence en acides aminés pour les cinq fructokinases alignées). De plus, cette sous classe présente elle même un motif peptidique caractéristique englobant les quatre acides aminés spécifiques de la famille PfkBI (soulignés):



On retrouve ce motif aussi bien chez les bactéries à Gram – (*Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Vibrio alginolyticus*) que chez les eucaryotes (*Solanum tuberosum*)

La sous- famille PfkBII réunit des kinases qui possèdent au niveau de l'extrémité carboxyle un motif constitué de 14 résidus d'acides aminés (Figure G9, page 65).

Ce motif commence par le dipeptide DT (glutamylthréonine) sauf pour les tagatose-6 phosphate kinases. Pour ces enzymes, le résidu glutamate (D₂₄₈) est remplacé par un résidu d'asparagine (N₂₄₈), et un résidu de proline (P₂₄₉) remplace le résidu de thréonine

FRUK_MYCGE/36-60	GGkGiNvAivmkslGfdptvitflG
FRUK_MYCPN/34-58	GGkGiNmAivmalfGikptvltflG
K1PF_BORBU/36-60	GGkGiNvStvlknlGkpstalgflG
K1PF_ECOLI/39-63	AGkGiNvAkvlkdLGidvtvggflG
K1PF_HAEIN/38-62	AGkGiNvAkvlkdLGvnvavggflG
K1PF_RHOCA/39-63	GGkGvNvAsflahvGhgvavtgllG
K1PF_XANCP/39-63	GGkGiNvAacladwGsqaalgvlG
K6P2_ECOLI/38-62	GGgGiNvAraiahLGgsataifpaG
LACC_LACLA/36-60	GGkGlNvTrvlyesGdkvtatgflG
LACC_STAAU/36-60	GGkGlNvTrvlaqvGepvlasgfiG
LACC_STRMU/36-60	GGkGlNvTrvlsqLGddvlasgllG
RBSK_BACSU/38-62	GGkGaNqAvaarLGaqvfmvgkvG
RBSK_ECOLI/41-65	GGkGaNqAvaagrSGaniafiactG
RBSK_HAEIN/39-63	GGkGaNqAvaarLGakvafisciG
RFAE_ECOLI/51-74	GG.AaNvAmniasLGanarlvglTg
SCRK_ECOLI/28-52	GGaPaNvAvgiarLGgtsgfigrvG
SCRK_KLEPN/28-52	GGaPaNvAvgvarLGgdsgfigrvG
SCRK_SALTY/28-52	GGaPaNvAvgvarLGgnsgfigavG
SCRK_SOLTU/43-67	GGaPaNvAiavtrLGgksafvqklG
SCRK_VIBAL/27-51	GGaPaNvAvaiarLSgksaffgrvG

Figure G8. Alignement des signatures protéiques de différentes enzymes de la famille PfkB I. Les acides aminés conservés sont marqués en rouge (100% d'identité), en bleu ($\geq 75\%$) et en vert ($\geq 50\%$). Le motif peptidique ScrK caractéristique des fructokinases de la famille PfkBI (GGAPXNVA(X)6G(X)9G) est en gris.

Les protéines alignées sont:

FRUK_MYCGE (1-phosphofruktokinase putative chez *Mycoplasma genitalium*);
 FRUK_MYCPN (1-phosphofruktokinase putative chez *Mycoplasma pneumoniae*);
 K1PF_BORBU (1-phosphofruktokinase putative chez *Borrelia burgdorferi*);
 K1PF_ECOLI (1-phosphofruktokinase putative chez *Escherichia coli*);
 K1PF_HAEIN (1-phosphofruktokinase putative chez *Haemophilus influenzae*);
 K1PF_RHOCA (1-phosphofruktokinase chez *Rhodobacter capsulatus*);
 K1PF_XANCP (1-phosphofruktokinase chez *Xanthomonas campestris*);
 K6P2_ECOLI (6-phosphofruktokinase, isoenzyme II chez *Escherichia coli*);
 LACC_LACLA (tagatose-6-phosphate kinase chez *Lactococcus lactis*);
 LACC_STAAU (tagatose-6-phosphate kinase putative chez *Staphylococcus aureus*);
 LACC_STRMU (tagatose-6-phosphate kinase chez *Streptococcus mutans*);
 RBSK_BACSU (ribokinase putative chez *Bacillus subtilis*);
 RBSK_ECOLI (ribokinase chez *Escherichia coli*);
 RBSK_HAEIN (ribokinase putative chez *Haemophilus influenzae*);
 RFAE_ECOLI (ADP-heptose synthase putative chez *Escherichia coli*);
 SCRK_ECOLI (fruktokinase putative chez *Escherichia coli*);
 SCRK_KLEPN (fruktokinase chez *Klebsiella pneumoniae*);
 SCRK_SALTY (fruktokinase chez *Salmonella typhimurium*);
 SCRK_SOLTU (fruktokinase chez *Solanum tuberosum*);
 SCRK_VIBAL (fruktokinase chez *Vibrio alginolyticus*);

INGK_ECOLI/352-365	NTnGAGDgalaALL
IOLC_BACSU/265-278	KTfGAGDsyasAFI
K1PF_BACSU/243-256	NSvGAGDsvvAGFL
K1PF_BORBU/244-257	STiGAGDsviAGFV
K1PF_ECOLI/249-262	STvGAGDsmvGGLI
K1PF_HAEIN/249-262	STvGAGDsmvAGLI
K1PF_RHOCA/251-264	STvGAGDamvAGLI
K1PF_XANCP/254-267	SSvGAGDamvAGLA
K6P2_ECOLI/250-263	STvGAGDsmvGAMT
KDGK_BACSU/255-268	DTvGAGDgfaVGVI
KDGK_ECOLI/258-271	DTtAAGDsf sAGYL
KDGK_ERWCH/259-272	DTtAAGDsf sAGYL
KDGK_HAEIN/257-270	DTtSAGDsfGFL
LACC_LACLA/248-261	NPvGSGDstvAGIA
LACC_STAAU/248-261	NPvGSGDstvAGIT
LACC_STRMU/248-261	NPvGSGDstvAGIT
RBSK_BACSU/236-249	DTtGAGDtfnAAFA
RBSK_ECOLI/249-262	DTiAAGDtfnGALI
RBSK_HAEIN/247-260	DTtAAGDtfnGGFV
RBSK_SCHPO/256-269	DTtAAGDtfiGAFS
RBSK_YEAST/277-290	DTtGAGDtflGGLV
SCRK_ECOLI/245-258	DStGAGDafvAGLL
SCRK_KLEPN/245-258	DTtGAGDafvAGLL
SCRK_RHILT/243-256	DTvGAGDtfdAGIL
SCRK_SALTH/159-172	DTtGAGDafvAGLL
SCRK_SALTY/245-258	DTtGAGDafvAGLL
SCRK_SOLTU/252-265	DTtGAGDsfvGALL
SCRK_VIBAL/243-256	DTtGAGDafvGGL

Figure G9. Alignement des signatures peptidique de différents membres de la famille PfkBII. Les résidus aminés conservés sont marqués en rouge (100% d'identité), en bleu ($\geq 75\%$) et en vert ($\geq 50\%$). Le motif peptidique ScrK caractéristique des fructokinases de la famille PfkBII (DTXGAGDXF) est en gris. Les protéines alignées sont:

INGK_ECOLI (inosine- guanosine kinase chez *Escherichia coli*);
 IOLC_BACSU (inositol kinase putative chez *Bacillus subtilis*);
 K1PF_BACSU (fructose 1- phosphate kinase putative chez *Bacillus subtilis*);
 K1PF_BORBU (1-phosphofructokinase putative chez *Borrelia burgdorferi*);
 K1PF_ECOLI(1-phosphofructokinase putative chez *Escherichia coli*);
 K1PF_HAEIN (1-phosphofructokinase putative chez *Haemophilus influenzae*);
 K1PF_RHOCA (1-phosphofructokinase chez *Rhodobacter capsulatus*);
 K1PF_XANCP (1-phosphofructokinase chez *Xanthomonas campestris*);
 K6P2_ECOLI (6-phosphofructokinase, isoenzyme II chez *Escherichia coli*);
 KDGK_BACSU (2- céto-3-déoxygluconate kinase putative chez *Bacillus subtilis*);
 KDGK_ECOLI (2-céto-3-déoxygluconate kinase putative chez *Escherichia coli*);
 KDGK_ERWCH (2-céto-3-déoxygluconate kinase chez *Erwinia chrysanthemi*);
 KDGK_HAEIN (2-céto-3-déoxygluconate kinase putative chez *Haemophilus influenzae*);
 LACC_LACLA (tagatose-6-phosphate kinase putative chez *Lactococcus lactis*);
 LACC_STAAU (tagatose-6-phosphate kinase putative chez *Staphylococcus aureus*);
 LACC_STRMU (tagatose-6-phosphate kinase chez *Streptococcus mutans*);
 RBSK_BACSU (ribokinase putative chez *Bacillus subtilis*);
 RBSK_ECOLI (ribokinase putative chez *Escherichia coli*);
 RBSK_HAEIN (ribokinase putative chez *Haemophilus influenzae*);
 RBSK_SCHPO (ribokinase putative chez *Schizosaccharomyces pombe*);
 RBSK_YEAST (ribokinase putative chez *Saccharomyces cerevisiae*);
 SCRK_ECOLI (fructokinase putative chez *Escherichia coli*);
 SCRK_KLEPN (fructokinase chez *Klebsiella pneumoniae*);
 SCRK_RHILT (fructokinase chez *Rhizobium leguminosarum*);
 SCRK_SALTH (fructokinase chez *Salmonella thompson*);
 SCRK_SALTY (fructokinase chez *Salmonella typhimurium*);
 SCRK_SOLTU (fructokinase chez *Solanum tuberosum*);
 SCRK_VIBAL (fructokinase chez *Vibrio alginolyticus*).

(T₂₄₉). De même, les fructose-6-phosphate kinases présentent un résidu de sérine (S₂₅₀) au lieu du résidu d'aspartate (D₂₅₀).

On retrouve ensuite en troisième position soit un résidu de thréonine (T) (chez 90% des fructokinases et ribokinases analysées), soit de valine (V) (présent chez les tagatose-6-phosphate kinases) soit encore d'asparagine (N) (chez les adénosine 5'-kinases).

Il suit après le tetrapeptide GAGD (glutamyl-asparagyl-glutamyl-D) qui devient AAGD chez les ribokinases d' *Escherichia coli* et d'*Haemophilus influenzae* ou encore GSGD chez toutes les tagatose-6-phosphate kinases analysées.

Les 7 derniers résidus aminés du motif PfkBII varient beaucoup en fonction de la nature du substrat phosphorylé:

- AF[VA]GGF[ML] pour les adénosine-5' kinases,
- [AT]F[VD][AG] [GA]LL pour les fructokinases,
- TF[N,I,L] [GA] [AG] [FL] [A,I,V,S] pour les ribokinases.

De façon similaire à la sous-famille PfkBI, les fructokinases PfkBII possèdent une forte homologie de séquence (environ de 80% des 14 acides aminés analysés sont identiques). Cela nous permet de définir le motif peptidique suivant, caractéristique des fructokinases de la sous famille PfkBII:

DT[TV]GAGDXFX[GA]GLL

Les résultats de cette analyse phylogénétique de différentes kinases, la plupart spécifiques des saccharides, suggère une évolution convergente des phosphotransférases à partir d'un ancêtre commun (Saier *et al.*, 1991). De plus, cela constitue un outil d'identification ou de confirmation de la fonction enzymatique d'une protéine à partir de motifs peptidiques caractéristiques d'une famille enzymatique.

II.4. Interactions Enzyme /Substrat

Les substrats naturels de la fructokinase sont l'ATP (le substrat nucléotidique, ou encore le donneur des résidus phosphorylés) et le fructose (le substrat saccharidique, ou accepteur). La fixation de l'ATP sur l'enzyme entraîne une modification conformationnelle de la protéine enzymatique qui permettrait la fixation du sucre et, par la suite, le transfert du groupement phosphate de l'ATP sur le C-6 du monosaccharide.

Chez *Leuconostoc mesenteroides* (Anderson et Sapico, 1975), *Lactococcus lactis* (Thompson *et al.*, 1991) et *E. coli* (Sebastian et Asensio, 1972), la fructokinase présente également une haute affinité pour le mannose, ce qui fait que la même enzyme soit appelée, dans ces cas, fructo (manno) kinase.

L'affinité de la fructokinase pour plusieurs donneurs phosphorylés a été étudiée et les résultats montrent que l'ATP n'est pas le seul NTP capable de participer à la phosphorylation du fructose (Tableau G11, page 69). D'autres nucléosides phosphate peuvent le remplacer, mais l'efficacité de la phosphorylation est diminuée.

II. 5. Cofacteurs

Toute enzyme utilisant l'ATP comme substrat nécessite la présence d'un cofacteur, généralement le Mg^{2+} . Ce cation joue le rôle de chélateur pour l'ATP et influence la mise en conformation de ce nucléotide (Pelmont, 1989).

D'autres cations divalents peuvent remplacer le Mg^{2+} , mais l'activité fructokinase, exprimée en μ moles de fructose-6-phosphate formées par minute et par mg de protéine baisse significativement (Sabater *et al.*, 1972, Thompson, 1991). Ces ions peuvent être classés dans l'ordre suivant:



Par contre, aucune activité fructokinase n'a pu être observée lors du remplacement du Mg^{2+} par les cations Ba^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Sr^{2+} , ou Sn^{2+} (Sebastian et Asensio, 1972, Sabater *et al.*, 1972 ; Thompson, 1991).

II. 6. Modulateurs

Plusieurs classes d'inhibiteurs des fructokinases bactériennes ont été mises en évidence :

- des agents chélateurs, tels que l'EDTA peuvent interagir d'une manière irréversible (à pH physiologique) avec le Mg^{2+} , empêchant donc la fixation de l'ATP au niveau du site catalytique de la fructokinase;

- des agents dénaturants, tels que la N-éthylmaleylimide, l'iodoacétate, l'iodoacétamide, ou le p-hydroxymercurobenzoate réagissent au niveau des groupements thiols (SH), provoquant des modifications irréversibles au niveau du site actif de l'enzyme;

- inhibition par le cofacteur : la présence du Mg^{2+} à des concentrations supérieures à 15mM inhibe la fructokinase (Sabater et Delafuente, 1975).

Il peut également y avoir inhibition par le produit de réaction. Par exemple, l'ADP inhibe d'une manière compétitive la fructokinase à des concentrations supérieures à 0,5mM. (Sabater *et al.*, 1972; Sebastian *et al.*, 1972); le même effet est réalisé par le fructose-6-phosphate; l'AMP inhibe la phosphorylation du fructose à faibles concentrations en ATP et stimule l'activité enzymatique à hautes concentrations en ATP (Doelle H.V., 1982).

II. 7. Paramètres fonctionnels

II. 7. 1. Le K_M

Les valeurs de la constante de Michaelis varient en fonction de l'organisme étudié et du substrat pris en considération (Tableaux G11 et G12, page 69). Elles illustrent, d'une part,

l'affinité de la fructokinase pour différents substrats (glucidiques et nucléotidiques) chez le même organisme, et d'autre part, les variations liées à la capacité de chaque espèce à phosphoryler le fructose.

II. 7. 1 .2. Le pH optimum

Les fructokinases identifiées chez différents genres bactériens restent actives pour des valeurs de pH comprises entre 6 et 10 (Tableau G13, page 69). Chez *Leuconostoc mesenteroides* (Anderson et Sapico, 1975) et chez *Escherichia coli* (Sebastian et Asensio, 1972) le profil des courbes illustrant les modifications d'activité fructo (manno) kinasique en fonction du pH varie en fonction du substrat glucidique utilisé. Ainsi, le pH optimum mesuré chez *Leuconostoc mesenteroides* est de 7 si le monosaccharide soumis à la phosphorylation est le fructose, mais il descend de 0,1 unités de pH si le substrat saccharidique de la fructokinase est le mannose.

II. 7. 1 .3. L'optimum de température

Toutes les expériences de dosage d'activité enzymatique ont été réalisées à la température ambiante (25° C). Chez *Streptomyces violaceoruber*, toute augmentation de température au-delà de 40° C entraîne une diminution drastique de l'activité fructokinase (Sabater et Delafuente, 1975) qui correspond, au niveau structural, à une dénaturation de la protéine.

II. 8. Localisation cellulaire

Toutes les fructokinases purifiées et étudiées provenaient de la fraction cytosolique des bactéries (Sabater *et al.*, 1972 ; Anderson et Sapico, 1975 ; Thompson *et al.*, 1991). Ces enzymes sont donc à localisation intracellulaire.

II. 9. Structure enzymatique

Le poids moléculaire indiqué dans la littérature est à relier avec le degré de purification de l'enzyme (partiel ou total) et avec la structure de l'enzyme, monomérique ou dimérique. Les informations portant sur ce sujet ont été rapportées dans le Tableau G14, page 70.

Du point de vue structural la fructokinase est une enzyme homodimérique chez *Lactococcus lactis* (Thompson. *et al.*; 1991), chaque sous-unité ayant un poids moléculaire de 32 KDa (purification par SDS -PAGE après réduction avec le β - mercaptoéthanol). De même, chez *Streptomyces violaceoruber*, l'enzyme est dimérique, mais le degré de purification de la protéine ne permet pas de connaître la nature des deux dimères (homo- ou hétérodimères) ni leur poids moléculaire.

Tableau G 11. Affinité des fructokinases des deux genres bactériens à Gram positif pour le substrat nucléotidique.

Organisme	NTP	Spécificité pour le donneur phosphorylé (%)	dNTP	Références
<i>Streptomyces violaceoruber</i>	ATP	100	dATP	Sabater, <i>et al.</i> , 1972
	ITP	60		
	GTP	50		
	CTP	30		
	UTP	20		
<i>Lactococcus lactis</i>	ATP	100	dATP dGTP	Thompson, <i>et al.</i> , 1991
	GTP	44		
	ITP	42,60		
	UTP	34,7		
	CTP	14,34		
	TTP	6		

Tableau G 12. Affinités (K_M) de quatre fructokinases bactériennes pour leurs substrats saccharidiques.

Organisme	Substrate	K_M (mM)	Références
<i>Streptomyces violaceoruber</i>	fructose	2	Sabater, <i>et al.</i> , 1972
<i>Lactococcus lactis</i>	fructose	3,2	Thompson, <i>et al.</i> , 1991
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	D-mannose	2,5	Anderson et Sapico, 1975
<i>Escherichia coli</i>	fructose	3,3	Sebastian et Asensio, 1972
<i>Escherichia coli</i>	mannose	5	Sebastian et Asensio, 1972

Tableau G 13. Optimum et maximum de pH pour cinq fructokinases bactériennes.

Organisme	pH optimum	Références
<i>Streptomyces violaceoruber</i>	8,8	Sabater, <i>et al.</i> , 1972
<i>Lactococcus lactis</i>	7	Thompson, <i>et al.</i> , 1991
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	7 (fructose)	Anderson et Sapico, 1975
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	6,9 (mannose)	Anderson et Sapico, 1975
<i>Zymomonas mobilis</i>	7,4	Weisser <i>et al.</i> , 1996

Tableau G 14. Poids moléculaire de quatre fructokinases bactériennes. La valeur du poids moléculaire varie en fonction du degré de purification de l'enzyme.

Poids moléculaire (kDa)	Organisme	Degré de purification	Références
80	<i>Streptomyces violaceoruber</i>	Sédimentation en gradient de glycérol	Sabater, <i>et al.</i> , 1972
20	<i>Streptomyces violaceoruber</i>	Gel filtration	Sabater, <i>et al.</i> , 1972
60	<i>Lactococcus lactis</i>	Ultracentrifugation à l'équilibre non dénaturant	Thompson, <i>et al.</i> , 1991
32	<i>Lactococcus lactis</i>	SDS-PAGE	Thompson, <i>et al.</i> , 1991
47	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-	Anderson et Sapico, 1975

II. 10. Propriétés moléculaires

Le clonage, le séquençage et la caractérisation du gène qui code pour différentes fructokinases bactériennes ont été réalisés chez les espèces suivantes : *Erwinia amylovora*, *Streptococcus mutans*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Bacillus subtilis* et *Zymomonas mobilis*.

Chez la plupart des genres bactériens analysés, le gène qui code pour la fructokinase, appelé *scrK*, fait partie de l'opéron saccharose. Par contre, chez *Zymomonas mobilis*, *Fusobacterium mortiferum*, *Rhizobium leguminosarum* et *Mezorhizobium lotii*, ce gène se situe dans un locus indépendant de l'opéron saccharose (Zembrzuski *et al.*, 1992, Robrish *et al.*, 1991 ; Fennington et Hughes, 1996). Lorsque ce gène a une telle localisation génomique, il est appelé *frK*.

II. 11. Conclusions

Les informations accumulées lors de cette étude bibliographique nous permettent de conclure que les différentes fructokinases bactériennes sont des enzymes cytosoliques de poids moléculaire d'environ 36 KDa. Selon la structure en acides aminés, ces molécules appartiennent à deux familles protéiques, ROK et PFKB. De point de vue fonctionnel, ces enzymes sont généralement des mannofructokinases qui utilisent préférentiellement les nucléotides dérivés de purine comme donneurs de résidus phosphoryle. Les valeurs des constantes de Michaelis pour ces deux substrats (saccharidique et nucléotidique) sont souvent déterminées à pH 7 et à la température ambiante (22°C).

Du point de vue génétique, dans la plupart des cas, les gènes codant pour différentes fructokinases bactériennes (*scrK* ou *sacK*) font partie de l'opéron saccharose (*scr* ou *sac*). Chez quatre organismes à Gram négatif ce gène, appelé *frK*, est isolé sur le chromosome.

Problématique et objectifs

Métabolisme du fructose chez B. longum

I. Intérêt de l'étude du métabolisme du fructose chez les bifidobactéries

I. 1. Les bifidobactéries, bactéries probiotiques

Dans leur habitat naturel, le colon des mammifères, les bifidobactéries utilisent comme substrats de croissance des oligo- et polysaccharides d'origine alimentaire mais non fermentescibles par l'hôte, ainsi que des structures protéiques provenant des sécrétions gastro-intestinales et du renouvellement cellulaire du tractus gastro-intestinal (Englyst *et al.*, 1987, Macfarlane *et al.*, 1986). La capacité particulière de ces microorganismes à dégrader une grande variété de substrats saccharidiques est corrélable, au niveau enzymatique, avec le nombre important de glycohydrolases mises en évidence chez ce genre bactérien. Du point de vue génétique, cette observation est soutenue par la détection, par voie bioinformatique, de plus de 30 gènes codant pour des glycohydrolases putatives et de plus de 8 opérons impliqués dans le transport des structures oligosaccharidiques (Schell *et al.*, 2002).

On prête aux bifidobactéries une grande variété d'effets bénéfiques pour l'hôte. Par exemple, les produits finaux du métabolisme saccharidique des bifidobactéries, le lactate et l'acétate, sont considérés comme responsables d'une stimulation de la prolifération des entérocytes et d'un effet inhibiteur envers la multiplication des bactéries dites indésirables (Gibson et Wang, 1994). D'autres effets bénéfiques tels qu'une diminution de l'intolérance au lactose, une stimulation sélective des défenses immunitaires, un effet de barrière contre l'implantation et la prolifération des microorganismes pathogènes dans l'intestin sont également attribués à la présence des bifidobactéries dans le colon (Van Loo *et al.*, 1999).

Par conséquent, des stratégies alimentaires visant l'augmentation du nombre des bifidobactéries dans le colon ont été envisagées dans le but d'améliorer l'état de santé et de bien être de l'individu. Ces stratégies proposent d'utiliser, comme compléments alimentaires, des produits contenant soit des bactéries dites bénéfiques (ou probiotiques, telles que les bifidobactéries et les lactobacilles), soit des molécules complexes, non digestibles par l'humain, mais sélectivement utilisés par les bactéries probiotiques (Gibson, 1999). Parmi ces molécules, généralement d'origine végétale, les fructooligosaccharides (FOS) occupent une place à part en raison de leurs effets stimulants pour la croissance de la flore bénéfique du colon.

I. 2. Les fructooligosaccharides, molécules prébiotiques

Dans le but de démontrer l'utilisation sélective des FOS (GF_n , $n \leq 10$) par les bifidobactéries, Wang et Gibson (1993) ont mesuré *in vitro* la quantité d'acides gras à courte chaîne et les volumes des produits gazeux (CO_2 , H_2S , etc.) formés lors de la croissance de différentes espèces bactériennes, normalement présentes dans les fèces humain, sur différents substrats saccharidiques (Wang et Gibson, 1993). Ces auteurs ont associé la quantité de ces produits métaboliques avec la capacité des espèces testées à dégrader ces substrats.

Deux types de cultures bactériennes ont été réalisées lors de ces expériences :

i) Dans un premier temps, des espèces appartenant à trois genres bactériens normalement présents dans le colon (*Bifidobacterium* sp., *Escherichia coli* et *Clostridium* sp.) ont été cultivées seules (en monoculture);

ii) Des co-cultures *Bifidobacterium* sp.-*Escherichia coli* et *Bifidobacterium* sp.-*Clostridium perfringens* ont été ensuite effectuées.

Lorsque l'expérience a été menée en monoculture, ces auteurs ont constaté que l'oligofructose permet la croissance de plusieurs espèces de *Bifidobacterium* (par exemple *B. bifidum* et *B. longum*), mais également celle d'*E. coli* et de *Clostridium perfringens* (Wang et Gibson, 1993). Ces derniers résultats contredisent les observations de Hidaka (1986), Mitsuoka (1987) et de leurs collaborateurs qui ont observé l'absence de croissance d'*E. coli* et de *C. perfringens* en présence de FOS (Hidaka *et al.*, 1986; Mitsuoka *et al.*, 1987).

Lorsque l'expérience a été réalisée en co-culture, en milieu minimum contenant une seule source de carbone (glucose ou FOS), Gibson et Wang (1992, 1994) ont obtenu les résultats suivants :

- 1) Pour *E. coli* et *C. perfringens*, le taux de croissance bactérienne obtenu en présence de glucose est plus important par rapport à l'oligofructose (Gibson et Wang, 1992). Il se peut donc, que la prolifération de ces deux genres bactériens sur FOS soit liée uniquement à l'utilisation du glucose contenu dans les FOS.
- 2) En co-culture à pH contrôlé, *B. longum* biovar. *infantis* inhibe la croissance d'*E. coli* et *C. perfringens* lorsque l'oligofructose est la seule source de carbone (Gibson et Wang, 1994). Selon ces auteurs, l'oligofructose serait donc un substrat prébiotique pour les bifidobactéries.

Ces auteurs ont conclu que l'oligofructose (β -(fructosyl)_n-saccharose, n \leq 10) et l'inuline (β -(fructosyl)_n-saccharose, 10<n \leq 60) stimulent sélectivement la croissance des bifidobactéries (Wang et Gibson, 1993). Dans le but de mieux comprendre l'utilisation sélective des oligomères de fructose (GF_n, n \leq 10) par les bifidobactéries, nous avons entrepris de caractériser, au laboratoire, le métabolisme de certains FOS (GF_n, n<5) par différentes espèces de *Bifidobacterium*. L'utilisation de ces substrats saccharidiques a été estimée par rapport au taux de croissance cellulaire (illustrée par la puissance thermique dégagée). Ce travail a permis d'obtenir des informations liées au transport et à l'hydrolyse des substrats oligosaccharidiques par les bifidobactéries.

I. 3. Aspects métaboliques de l'utilisation des FOS par les bifidobactéries

I. 3. 1. Analyse du taux de croissance des bifidobactéries par mesure de la puissance thermique dégagée

Une étude calorimétrique de l'utilisation des FOS à faible DP (DP<5) par cinq espèces de *Bifidobacterium* normalement présentes dans l'intestin humain a été effectuée dans notre laboratoire par le Dr. F. Krzewinski (résultats non publiés). Lors de cette étude, il a été constaté que toutes les espèces étudiées (*B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B.*

longum, *B. pseudocatenulatum*) étaient capables d'utiliser ces FOS comme seule source de carbone.

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.

Une situation particulière a été observée lors de l'analyse du profil de croissance de *B. longum*, la seule espèce de *Bifidobacterium* présente chez l'Homme tout au long de la vie. En effet, les différentes souches de *B. longum* analysées ségrégent en deux catégories selon leur habilité à fermenter ces substrats saccharidiques (F. Krzewinski, résultats non publiés).

Une première catégorie de souches de *B. longum* présente une croissance rapide en milieu de Garches contenant des FOS comme seule source de carbone (phénotype FOS⁺) (Figure P1, page 75). Par exemple, l'analyse du thermogramme obtenu lors de la croissance de la souche notée *B. longum* FOS⁺ indique un pic de puissance thermique (1000 μW) après seulement 5 heures de culture (Figure P1, page 75). Toutefois, cette valeur est considérée comme étant faible. En effet, dans les mêmes conditions de culture, les espèces *B. breve* et *B. pseudocatenulatum* présentent un maximum de puissance thermique de 1800 à 2000 μW (F. Krzewinski, résultats non publiés).

Une deuxième catégorie de souches de *B. longum* réunit les sous espèces qui sont incapables de croître en présence de ces FOS comme seule source de carbone (phénotype FOS⁻) (Figure P1, page 75). Par exemple, la puissance thermique mesurée lors de la croissance de la souche appelée *B. longum* FOS⁻ sur ce substrat saccharidique est très faible (inférieure à 100 μW) (F. Krzewinski, résultats non publiés).

Ces résultats mettent en évidence que:

1. Le taux de croissance de différentes espèces de bifidobactéries d'origine intestinale humaine en présence de FOS comme seule source de carbone varie selon l'espèce et la souche analysée.
2. Par rapport aux autres espèces de *Bifidobacterium*, *B. longum* métabolise peu ou pas les substrats oligosaccharidiques contenant du fructose.

I. 3. 2. Mise en évidence des enzymes capables d'hydrolyser les FOS

Dans le but de comprendre l'utilisation sélective des FOS par les bifidobactéries, trois équipes différentes ont purifié et caractérisé trois enzymes présentant une activité β-fructofuranosidase. Dans les trois cas, l'enzyme a été détectée dans l'extrait cellulaire et présente également une importante activité saccharose hydrolase (Muramatsu *et al.*, 1992; Imamura *et al.*, 1994; Ehrmann *et al.*, 2003). Les molécules de glucose ainsi libérées constituent un substrat de croissance non sélectif, ce qui confirme les résultats de Wang et Gibson (1992).

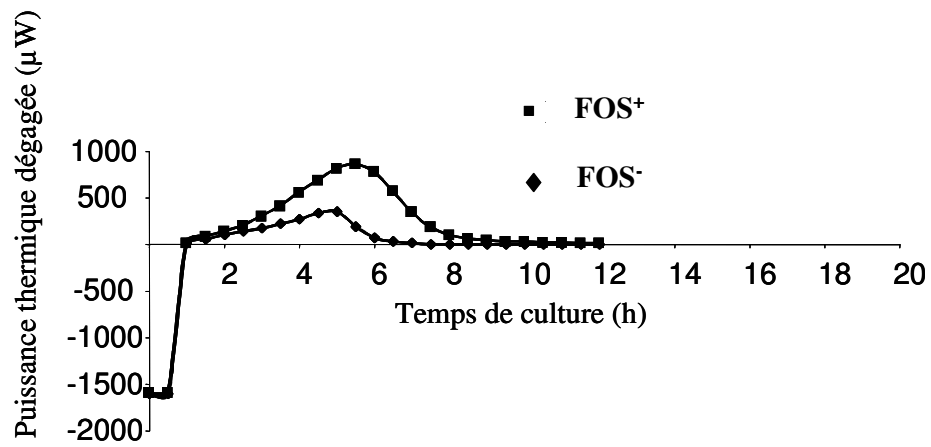


Figure P1. Thermogramme obtenu lors de l'incubation de deux souches de *B. longum* (phénotypes FOS⁺ et FOS⁻, respectivement) en milieu de Garches contenant un mélange de FOS (DP<5) comme seule source de carbone (F. Krzewinski, résultats non publiés).

La spécificité des trois β -fructofuranosidases pour l'oligofructose varie selon le nombre de résidus fructosyl présents dans la molécule du substrat. Ainsi, la β -fructofuranosidase purifiée à partir de l'extrait cellulaire de *B. adolescentis* dégrade préférentiellement le 1-ketose (GF₂) (Muramatsu *et al.*, 1992). L'enzyme hydrolyse également le nistose (GF₃) et, avec une moindre efficacité, l'inuline (GF_n) (Muramatsu *et al.*, 1992). L'enzyme BfrA purifiée par Ehrmann et collaborateurs à partir de *B. lactis* est une saccharose hydrolase capable de dégrader non seulement le saccharose (100% d'activité relative), mai aussi le GF₂ (91% d'activité relative), le GF₃ (80% d'activité relative) et l'inuline (37% d'activité relative) (Ehrmann *et al.*, 2003). Imamura et collaborateurs (1994) ont caractérisé chez *B. longum* biovar *infantis* une β -fructofuranosidase qui agit préférentiellement sur les GF₃ (3,6 fois plus d'activité par rapport au saccharose) (Imamura *et al.*, 1994). Cette enzyme hydrolyse aussi le GF₂ (3 fois plus d'activité par rapport au saccharose) et l'inuline (1,4 fois plus d'activité par rapport au saccharose) (Imamura *et al.*, 1994).

On peut ainsi conclure que les trois espèces de *Bifidobacterium* analysées, dont *B. longum*, possèdent les enzymes nécessaires à l'hydrolyse des FOS.

I. 3. 3. Métabolisme intracellulaire des FOS chez *Bifidobacterium* sp.

Notre hypothèse est que le caractère sélectif attribué à l'utilisation des FOS par les bifidobactéries serait lié, dans un premier temps, aux capacités de ces microorganismes à transporter des structures oligosaccharidiques (OS) à travers la paroi cellulaire et de les dégrader en interne. Ainsi, dans notre laboratoire, il a été observé que, chez *B. bifidum*, le transport des galactooligosaccharides à travers la paroi cellulaire est 22 fois plus rapide par rapport au transport du galactose (Derensy-Dron *et al.*, 1999 ; F. Krzewinski, résultats non publiés). Il apparaît donc que le transport des structures oligosaccharidiques à faible DP pourrait constituer un premier facteur impliqué dans l'utilisation sélective des OS par les bifidobactéries.

Un deuxième aspect concernant l'utilisation sélective des oligomères de fructose par les bifidobactéries pourrait être lié au métabolisme des molécules de fructose résultant de l'hydrolyse intracellulaire des FOS. Toutefois, aucune étude portant sur le devenir intracellulaire de ces monomères n'a encore été réalisée. L'objectif global de ce travail est donc d'identifier les enzymes responsables de la dégradation intracellulaire du fructose chez *Bifidobacterium longum*.

Chez les bifidobactéries, la voie de la F6PPK représente la principale voie du catabolisme des monosaccharides. Dans un premier temps, nous nous sommes donc proposé d'identifier le(s) voie(s) métabolique(s) permettant la dégradation intracellulaire du fructose chez *B. longum*.

Chez les bactéries, la phosphorylation des monosaccharides représente généralement la première étape du catabolisme de ces molécules. Ces enzymes nécessitent la présence d'un donneur de résidu phosphoryle (l'ATP ou le PEP) et sont souvent caractérisées par une spécificité de substrat réduite (*e.g.* hexokinases, mannofructokinases etc.). Nous nous sommes donc également proposé d'identifier le(s) kinase(s) responsable(s) de l'intégration du fructose dans le(s) voie(s) de dégradation intracellulaire et d'analyser leurs propriétés enzymatiques par rapport aux autres kinases spécifiques des monosaccharides décrites dans la littérature.

Il existe actuellement peu d'informations liées à la régulation de l'expression génétique chez les bifidobactéries. Dans leur analyse bioinformatique de la séquence nucléotidique du génome de *B. longum*, Schell et collaborateurs (2002) ont remarqué que les bifidobactéries utiliseraient préférentiellement la régulation négative de l'expression des gènes impliqués dans le catabolisme saccharidique. Ce type de régulation permettrait à ces microorganismes une réponse rapide et flexible suivant les conditions nutritionnelles variables dans leur environnement (Schell *et al.*, 2002). Par conséquent, une étude de l'influence de la source de carbone sur l'expression des gènes impliqués dans le catabolisme du fructose a été réalisée. Cette analyse a été focalisée sur l'enzyme responsable de la première étape de la transformation intracellulaire du fructose chez *B. longum*.

Cette approche du métabolisme du fructose chez *B. longum* nous permettra de situer notre travail dans le contexte général des études menées sur la relation existant entre la flore intestinale et le type d'alimentation.

Matériels et Méthodes

I. Souches bactériennes et plasmides

Les souches bactériennes et les plasmides utilisés dans ce travail sont décrits dans le Tableau M1, page 79.

II. Milieux et conditions de culture

II. 1. Milieux de culture

Les milieux complets et synthétiques habituellement employés sont préparés selon Miller (1972). Les milieux solides correspondants contiennent 15 g d'agar par litre de milieu. En milieu semi synthétique, les saccharides sont ajoutés aux concentrations finales de 2 g/L.

Les antibiotiques sont ajoutés aux concentrations finale suivantes : ampicilline, 100 mg/L; chloramphénicol, 20 mg/L; kanamycine, 50 mg/L.

Les milieux sont autoclavés pendant 30 minutes à 121°C et à une pression de 1 bar. Les solutions stock de saccharides, d'acide para-amino benzoïque et de vitamines sont stérilisées par filtration et ajoutées au milieu après autoclavage.

La composition des différents milieux de culture utilisés est décrite ci-dessous :

II. 1. 1. Milieux riches

Milieu riche LB (Luria-Bertani)

NaCl, 10 g/L ; bactotryptone (Difco) 10 g/L ; extrait de levure (Difco) 5 g/L ; pH=7. Ce milieu est utilisé pour la croissance et la prolifération de différentes souches d'*E. coli*.

Milieu riche TPY (Trypticase Phytone Yeast, Scardovi 1986)

Bio-trypticase (Biomérieux), 10g/L ; Bio-soyase (Biomérieux), 5g/L ; extrait de levure (DIFCO), 2,5g/L ; Tween 80 (Sigma), 1g/L ; chlorhydrate de cystéine 0,5g/L ; K₂HPO₄, 2H₂O, 2,6g/L ; MgCl₂, 6H₂O, 0,5g/L ; ZnSO₄, 7H₂O 0,25g/L ; FeCl₃ 10mg/L ; CaCl₂, 2H₂O, 0,2g/L ; Glucose, 5g/L ; pH 6,1. Ce milieu est utilisé pour la croissance et la prolifération des différentes souches de *Bifidobacterium longum*.

Milieu indicateur MacConkey

Bactopeptone, 17 g/L ; protéose peptone 3 g/L ; sels biliaires, 1,5 g/L ; NaCl, 1,5 g/L ; rouge neutre 30 mg/L ; violet cristal 1 mg/L. On peut ajouter à ce milieu différents saccharides (saccharose) comme source de carbone. Les souches d'*E. coli* dégradant cette source de carbone forment des colonies rouges, tandis que les autres souches développent des colonies blanches.

Tableau M1. Souches bactériennes et plasmides utilisés.

Souches bactériennes ou plasmides	Description	Source ou références
Souche bactérienne		
<i>B. longum</i> DSM 20219	Souche type	Skerman <i>et al.</i> , 1980
<i>B. longum</i> A10C	Souche sauvage	Ce travail ^a
<i>B. longum</i> A 133	Souche sauvage	Ce travail ^a
<i>B. longum</i> BS 52 60 B4	Souche sauvage	Ce travail ^a
<i>B. longum</i> BS 57 63 B4	Souche sauvage	Ce travail ^a
<i>B. longum</i> BS 37 58 B5	Souche sauvage	Ce travail ^a
<i>B. longum</i> BS 8 57 A2	Souche sauvage	Ce travail ^a
<i>B. longum</i> BS 36 68 A2	Souche sauvage	Ce travail ^a
<i>B. longum</i> BS 104 74A3	Souche sauvage	Ce travail ^a
<i>B. longum</i> BS 101 79A3	Souche sauvage	Ce travail ^a
<i>B. longum</i> BS 175 80A5	Souche sauvage	Ce travail ^a
<i>B. longum</i> B 7 PC	Souche sauvage	Ce travail ^a
<i>B. longum</i> B 773 MC	Souche sauvage	Ce travail ^a
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁺ { <i>lacI</i> ^q Tn10(Tet ^R)} <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74recA1araD139D(ara-leu)</i> 7697 <i>galUgalK</i> rpsL(Str ^R) <i>endA1nupG</i>	Stratagene
<i>E. coli</i> BL 21 (DE3)/pLysS	F ⁺ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3)/pLys (Cm ^r)	Stratagene, Studier <i>et al.</i> , 1990.
Plasmides		
pCR2.1	Ap ^R , 3,9 kb	Stratagene
pFRK1	pCR2.1 portant un insert de 894 pb représentant le gène <i>frK</i> ; 4,8 kb	Ce travail
pET28 (a+)	Kan ^R LacI, vecteur d'expression, 5,4 kb	Novagen
pFRK2	pET28 portant un insert de 894 pb représentant le gène <i>frK</i> ; 6,3 kb	Ce travail
pBC	Cm ^R	Collection du laboratoire
pDG7	Ap ^R , Cm ^R . Plasmide navette <i>E. coli</i> - <i>Bifidobacterium</i> sp.	Rossi <i>et al.</i> 1992.

^a Ces souches sont d'origine intestinale humaine et ont été identifiées comme souches de *B. longum* par test d'hybridation ADN-ADN. (F. Gavini, communication personnelle).

II. 1. 2. Milieu de Garches modifié (Krzewinki *et al.*, 1997)

Le milieu de Garches modifié est un milieu semi synthétique. Il est utilisé pour déterminer la capacité des bifidobactéries à assimiler un saccharide comme seule source de carbone. Le milieu de Garches modifié est composé de : casamino-acides (MERCK), 10g/L; extrait de levure (DIFCO), 2,5g/L; chlorhydrate de cystéine, 0,5g/L; Acétate de sodium, 3,66g/L; Na₂HPO₄, 12H₂O, 2,33g/L; K₂HPO₄, 0,9g/L; MgSO₄, 7H₂O, 0,5g; acide p-aminobenzoïque, 1mg/L; Biotine, 0,01mg/L; Pantothénate de calcium, 1mg/L; pH 6,1. L'acide p-aminobenzoïque, les vitamines et les saccharides sont ajoutés au milieu après stérilisation par filtration.

II. 2. Conditions de culture

II. 2. 1. Conditions de culture des souches d'*E. coli*

Les souches d'*E. coli* utilisées sont conservées sur milieu riche (LB agar) à 4°C. Elles sont repiquées régulièrement toutes les quatre à six semaines.

Pour l'utilisation courante, les cultures sont effectuées en milieu liquide sous agitation à 37°C. La mise en culture liquide passe par une étape de préparation qui est la préculture. Cette dernière permet l'adaptation des cellules au changement des conditions de culture, leur prolifération et le contrôle du nombre des cellules qui vont être inoculées dans la culture principale. La préculture est réalisée dans 2 à 3 mL de milieu LB (supplémenté si nécessaire avec l'antibiotique dans la quantité appropriée), jusqu'à une densité optique d'environ 0,35 unités d'absorption ($\lambda=600$ nm).

Les milieux de culture liquides sontensemencés à environ 1/50^e du volume de culture, à partir de la préculture. Les précultures et les cultures sont soumises à une agitation continue d'environ 300 rpm/minute.

II. 2. 1. Conditions de culture des souches de *Bifidobacterium longum*

Les bactéries sont incubées à 39°C en jarre anaérobie sous atmosphère H₂/CO₂ (Gas-Pak anaerobic system, Biomérieux). Les tubes renfermant 4,5 mL de milieu sont inoculés avec un volume de 500 μ L de suspension bactérienne provenant d'une préculture de 16 heures.

III. Analyse phénotypique des souches de *B. longum*

Toutes les souches de *B. longum* utilisées dans ce travail ont été analysées pour leur capacité à croître en présence de fructose comme seule source de carbone. Pour ce faire, sauf indications contraires, deux précultures ont été effectuées. Dans un premier temps, 500 μ L de culture bactérienne provenant d'une préculture effectuée en milieu riche (TPY) ont été ajoutés à 4,5 mL de milieu de Garches modifié supplémenté avec du monosaccharide (D- fructose ou D-glucose, 10 g/L). Après 16 heures de culture, un

volume de 500 μ L de culture bactérienne a servi d'inoculum pour 4,5 mL du même milieu. Les souches ont été cultivées pendant 24 h et 48 h dans le milieu Garches contenant du fructose à 10 g/L. Les cultures effectuées en milieu Garches contenant du glucose (10g/L) ont servi de témoin positif de croissance. L'expérience a été conduite en observant la présence ou non d'un trouble du milieu de culture, correspondant à une croissance bactérienne.

Les protocoles de base pour la digestion par les endonucléases de restriction, les clonages en bouts cohésifs ou francs, la préparation des gels d'agarose et les conditions de migration sont ceux décrits par Sambrook et collaborateurs (1989).

IV. 1. Préparation d'ADN plasmidique par chromatographie d'échange de cations

L'extraction est effectuée avec les kits « QIAprep®Midiprep » (minipréparation) ou « QIAprep®Midiprep » (midipréparation) (Qiagen). Dans les deux cas, le protocole est basé sur le principe de la lyse alcaline qui est suivie d'une purification sur colonne échangeuse de cations (silicagel). Le protocole de la midipréparation d'ADN plasmidique sera présenté ci-dessous.

La culture des cellules d'*E. coli* se fait à partir d'une colonie unique, dans un milieu riche LB contenant de l'antibiotique correspondant à la résistance du plasmide à purifier.

Une centrifugation de 10 minutes à 6000g permet de culotter les bactéries qui sont remises en suspension dans un tampon composé de Tris-HCl, 50 mM, pH8 ; EDTA, 10 mM de RN-ase A 100 μ g/mL. Les cellules sont ensuite lysées dans 200 mM de NaOH et 1% SDS. Le lysat est neutralisé par addition d'acétate de potassium, 3 M, pH 5,5 qui précipite les protéines et l'ADN chromosomique. L'ADN plasmidique reste en solution. Une centrifugation de 30 minutes à 20000 g permet d'éliminer les débris précipités. Le surnageant qui contient l'ADN plasmidique est chargé sur une colonne échangeuse de cations. En conditions de faible concentration saline, (0,75 M NaCl), à pH 7, l'ADN se lie à la résine. Un lavage à concentration saline moyenne (1 M NaCl) permet d'éliminer les ARN, les protéines et autres impuretés de faible poids moléculaire. L'ADN plasmidique est finalement élué avec de l'eau.

IV. 2. Préparation d'ADN chromosomique de *Bifidobacterium longum*

IV. 2. 1. Lyse bactérienne

L'extraction est réalisée à partir de 500 mg de culot bactérien. Le culot est repris dans 2,5 mL de Tampon TE (Tris 0,05 M pH 8 ; EDTA 1 mM) contenant du lysozyme (150000 à 600000 unités). La lyse cellulaire s'effectue par incubation durant une heure à 37°C, sous agitation grâce à une table d'agitation.

Après l'incubation, afin de bloquer l'action des nucléases, on ajoute au culot bactérien un volume de tampon TE correspondant à la somme des volumes de suspension bactérienne et de solution de lysozyme. La concentration finale en EDTA doit être de 0,05 M. Le mélange est alors remis sur la table d'agitation, à 37°C, pendant 10 minutes.

La lyse cellulaire continue par l'addition du SDS. Cette molécule provoque l'éclatement des structures lipidiques de la membrane bactérienne. Le SDS à 10% (p/v) est ajouté lentement (1mL pour 500 mg de culot bactérien humide). Le mélange reste en agitation dans les mêmes conditions que précédemment pendant 10 minutes.

La digestion des protéines est réalisée par traitement à la Protéinase K (100 µL) pendant une heure à 37°C sous agitation.

IV. 2. 2. Extraction et purification de l'ADN génomique

L'addition de 3 mL d'une solution contenant du NaCl, 0,7 mM, suivie d'une incubation de 10 minutes à 65 °C permet la précipitation des protéines restantes. L'extraction proprement dite s'effectue en deux étapes :

i) L'addition d'un volume de phénol/chloroforme suivi d'une centrifugation de 10 minutes à 10000g permet d'isoler l'ADN dans la phase aqueuse. Cette étape est répétée deux fois, puis la phase aqueuse est reprise dans un volume de chloroforme/acide isoamylique (24/1) et centrifugé à nouveau à 10000g pendant 10 minutes.

ii) La phase aqueuse est récupérée et l'ADN est précipité par addition de 1/10^{ème} de volume d'acétate de sodium et deux volumes d'éthanol froid (-20°C). La précipitation de l'ADN se traduit par la formation d'une pelote que l'on prélève à l'aide d'une pipette effilée. L'ADN génomique est alors lavé dans une solution d'alcool à 70%, séché et repris dans de l'eau.

IV. 2. 3. Amplification enzymatique d'ADN double brin : méthode PCR (Polymerase Chain Reaction).

IV. 2. 3. 1. Principe

La PCR repose sur le fait que les ADN polymérasés sont capables de copier un simple brin d'ADN pour synthétiser le brin complémentaire en utilisant comme amorce un petit segment d'ADN (amorce) qui s'hybride à l'extrémité 3' du brin à copier. La PCR se fait simultanément sur les deux brins de l'ADN après la dénaturation thermique du double brin. Deux amorces sont utilisées, chacune étant complémentaire d'un des deux brins et à l'extrémité 3' de la région à copier sur ce brin. L'opération se répète plusieurs fois. Chaque cycle successif de synthèse utilise comme matrice les brins d'ADN de départ et, au fur et à mesure, les brins d'ADN synthétisés au cours des cycles précédents.

A chaque cycle, la quantité d'ADN est multipliée par 2 à condition que toutes les matrices soient disponibles. Par exemple, après 30 cycles, on dispose de plus de 10⁹ copies de la région amplifiée.

La PCR utilise des ADN polymérasés résistant à des températures élevées (92 à 95°C) et qui donc ne sont pas inactivées aux températures utilisées lors de l'étape de dénaturation de l'ADN. L'ADN polymérase la plus couramment employée est la *Taq* polymérase de l'espèce bactérienne thermophile *Thermus aquaticus*. Ces enzymes ont une activité maximale à des températures élevées, ce qui permet de synthétiser l'ADN à une température où des hybridations non spécifiques entre les amorces et la matrice sont instables.

La réaction de PCR se décompose en 3 brèves étapes :

1. la dénaturation de l'ADN double brin (à 92-95°C) ;

2. l'hybridation des amorces oligonucléotidiques à l'ADN simple brin, à une température d'hybridation (Th) qui est à déterminer ;
3. la synthèse de l'ADN à 70-72°C.

La température d'hybridation est choisie en fonction de la température de dénaturation (Td) du complexe formé entre l'amorce et la matrice, selon la formule empirique suivante, valable pour des amorces cortès (jusqu'à 24-26 pb) :

$$\begin{aligned} T_d &= 4X + 2Y \\ T_h &= T_d - 5^\circ\text{C} \end{aligned}$$

où X représente le nombre des liaisons G-C et l'Y le nombre des liaisons A-T. En règle générale, la Td doit être supérieure à 48°C.

IV. 2 3. 2. Mode opératoire

Un volume d'environ 1 µL d'ADN génomique (50 pmoles) sert de matrice à une PCR (400µM de chaque dNTP; tampon PCR 10X, 5 µL; amorce 1 (sens), 10µM, 2µL; amorce 2 (anti sens), 10µM, 2µL; Taq Polymérase (Promega) 0.5U; H₂O qsp 50µL). Les tubes sont placés dans un thermocycler automatique (Eppendorf) qui réalise ensuite les variations de température suivantes: une dénaturation de 5 min à 94°C, 29 cycles d'amplification comportant chacun une dénaturation de 30 sec à 94°C, une étape d'hybridation des amorces de 60 sec à 55°C et une élongation de 1 min à 72°C. La composition du tampon PCR 10X est la suivante : Tris-HCl, 200 mM ; (NH₄)₂SO₄, 160 mM ; MgCl₂, 25 mM ; BSA, 1,5 mg/mL.

Les produits de PCR peuvent ensuite être gardés à 4°C pendant la journée ou stockés à -20°C, afin d'être analysés par électrophorèse sur gel d'agarose. Lorsque l'analyse du profil de migration en gel d'agarose révèle la présence de plusieurs bandes, dans un premier temps, une deuxième PCR en gradient de température (de 50 à 60°C) et/ou de MgCl₂ (de 15 à 25 mM) est réalisée à partir de l'ADN génomique. Puis, si ces bandes sont toujours détectables, elles sont découpées du gel, cloné et séquencées.

IV. 3. Digestion, électrophorèse, isolement et ligation des fragments d'ADN

IV. 3. 1. Digestion de l'ADN par enzymes de restriction

Les enzymes de restriction reconnaissent des séquences nucléotidiques spécifiques d'ADN double brin et coupe l'ADN à l'intérieur ou à proximité de ces séquences. Suivant le type de coupure, des extrémités différentes sont obtenues :

- 1) cohésives ou « à bouts collants », comme par exemple les endonucléase *Bam*HI, *Hind*III, *Nde*I, *Sau*3AI
- 2) à bouts francs comme l'endonucléase *Eco*RV.

Définition de l'unité : une unité d'activité endonucléasique représente la quantité d'enzyme nécessaire pour produire une digestion complète de 1 µg d'ADN de phage λ en 60 minutes à la température optimale.

Dans ce travail, nous avons utilisé 10 unités d'enzyme par μg de plasmide et 5 unités d'enzyme par μg d'ADN génomique. Pour que leur activité soit optimale, les enzymes de restriction ont été utilisées dans le tampon d'incubation et à la température recommandée par les fournisseurs (le plus souvent 1 heure à 37°C). La réaction est arrêtée en inactivant les enzymes à la chaleur (les tubes de digestion sont transférés dans un bain à 65°C pendant 15 minutes).

IV. 3. 2. Electrophorèse sur gel d'agarose

La séparation des fragments d'ADN linéaire s'est effectuée par migration électrophorétique à travers un gel d'agarose (de 0,4 à 2% suivant la taille des fragments à séparer).

Le tampon de migration est composé de TBE (Tris-HCl, 10,8 g/L ; acide borique, 5,5 g/L ; EDTA 2mM pH 8) et contient 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de BET (bromure d'éthidium). Le BET est un agent intercalant de l'ADN, fluorescent après excitation dans l'ultraviolet. La taille d'un fragment d'ADN est déterminée par comparaison avec celle de marqueurs de poids moléculaire (Figure M1, page 85).

Le dépôt dans le puit du gel se fait en ajoutant à la solution d'ADN une solution de dépôt contenant du glycérol. La migration est suivie grâce à des colorants contenus dans la solution de dépôt (bleu de bromophénol, 0,25% ; xylène cyanol, 0,25% ; EDTA, 25 mM ; glycérol, 50%). La migration se fait de la cathode vers l'anode sous tension constante, à raison de 2 à 10 Volts par centimètre séparant les électrodes.

IV. 3. 3. Isolement d'un fragment d'ADN à partir d'un gel d'agarose

La purification des fragments de restriction s'avère nécessaire lorsque des manipulations de sous-clonage ainsi que des expériences d'hybridation sont envisagées. Les différents fragments d'ADN sont tout d'abord séparés sur un gel d'agarose de concentration adéquate (0,4 à 2%).

Nous avons utilisé le kit « Qiaquick gel extraction » (Qiagen). Les conditions du kit ont été suivies précisément. Brièvement, après migration, les fragments d'ADN sont coupés du gel. Le morceau d'agarose contenant le fragment d'ADN d'intérêt est dissout dans le tampon fourni, à 55°C . Le mélange est ensuite transvasé dans un tube (de format microtube) contenant une membrane de gel de silice où l'ADN s'adsorbe lors d'une centrifugation. Après lavage avec 700 μL tampon de lavage (contenant de l'éthanol à 70%), l'ADN est élué par un volume de 30 à 50 μL d'eau.

IV. 3. 4. Précipitation alcoolique de l'ADN

L'ADN est précipité par de l'éthanol (concentration finale supérieure à 70%) en présence d'une concentration salinée élevée. On ajoute 1/10^e de volume d'acétate de sodium 3M, pH 5 et 2,5 volumes d'éthanol 100%. Pour de faibles quantités d'ADN ou pour des molécules de petites taille (déoxynucléotides non incorporés, amorces oligonucléotidiques en excès) la précipitation est réalisée pendant 2 heures à -20°C ou durant 30 minutes à -80°C . Dans les autres cas, après agitation, le mélange est incubé pendant 0 à 10 minutes à température ambiante. Le mélange est ensuite centrifugé 5 à 20 minutes à 10000 g à température ambiante ou à 4°C . Le surnageant est ensuite éliminé délicatement. Le culot

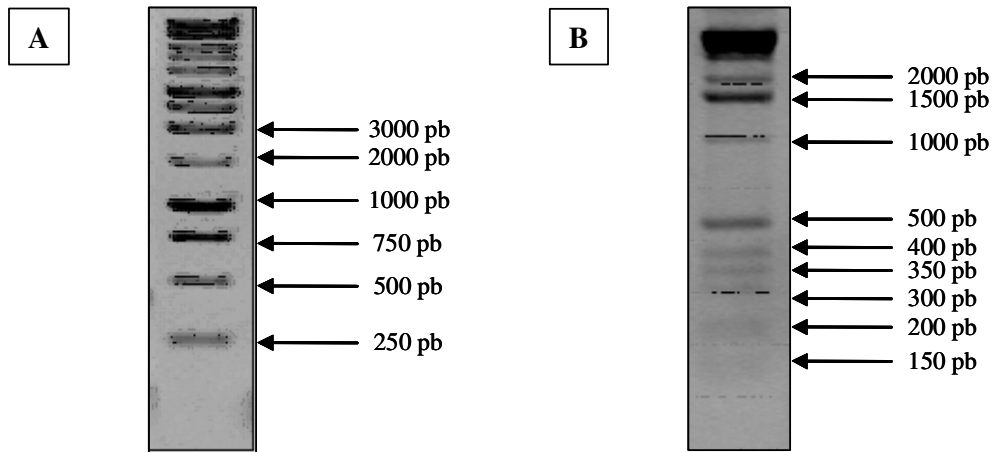


Figure MM1. Témoins nucléotidiques de masse moléculaire utilisés dans cette étude. **A)** Témoin de masse moléculaire 1kb, Promega. La séparation des fragments nucléotidiques a été réalisée en gel d'agarose à 1,5 %. **B)** Témoin de masse moléculaire X, Roche. La séparation des bandes a été effectuée en gel d'agarose à 1 %.

est rincé à l'éthanol 70%, puis séché sous vide. L'ADN est repris dans l'eau UHQ, généralement dans un volume de 10 à 50 μ L.

IV. 3. 5. Ligation des brins d'ADN

Principe

La ligation consiste en la formation de nouvelles liaisons phosphodiester entre les résidus phosphate situés à l'extrémité 5' et les groupements hydroxyl de l'extrémité 3' des deux fragments d'ADN à liguer. Les extrémités à bouts francs sont toutes compatibles entre elles, alors que des extrémités à bouts collants ne seront liguées que si elles sont complémentaires les unes des autres, donc compatibles. On peut obtenir ces liaisons *in vitro* grâce à la T4 DNA ligase.

Mode opératoire

Dans le milieu réactionnel sont ajoutés 0,1 volume de tampon ligase concentré 10X, 1 à 2 unités de T4 DNA-ligase (Roche), l'ADN du vecteur et l'ADN insert (dans des proportions de l'ordre 1/5 à 1/10) et de l'eau, qsp 1 mL. L'incubation se fait à 15°C pendant une nuit ou 2 heures à température ambiante.

Dans le but de diminuer la formation des concatémères (ligation des deux plasmides linéarisés présentant des extrémités 5' et 3' complémentaires), préalablement à la ligation, le vecteur peut être déphosphorylé par une phosphatase alcaline (Shrimp phosphatase alcaline, Roche). Pour cela, le vecteur linéarisé est incubé pendant 30 minutes à 37°C, en présence de 1 à 2 unités de phosphatase alcaline dans le tampon de restriction contenant les ions Mg^{2+} (cofacteurs de la phosphatase alcaline). Ce qui permet d'éliminer le résidu 5' phosphate et prévient donc la récircularisation du vecteur. Ainsi, seuls les vecteurs ayant intégré un fragment d'ADN contenant l'extrémité 5' phosphorylée pourront se circulariser.

IV. 3. 6. Remplissage de l'extrémité 5' protubérante par l'enzyme de Klenow

Principe

Le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I d'*E. coli* peut être utilisé pour convertir une extrémité 5' protubérante, obtenue par digestion grâce à un enzyme de restriction, en une extrémité à bouts francs.

Mode opératoire

Cette technique a été utilisée lors du clonage des fragments d'ADN aux extrémités cohésives dans un plasmide présentant, après digestion enzymatique, des extrémités nucléotidiques à bouts francs. Dans ce but, 10 μ g d'ADN_g de *B. longum*, digéré par deux endonucléases conduisant aux extrémités cohésives, ont été incubés à température ambiante en présence d'1 μ L de mélange de dNTPs (2,5 mM chacun), une unité d'enzyme Klenow (Roche) et d'eau, qsp 100 μ L. Après 30 minutes, l'enzyme a été inactivée par

chauffage à 70°C pendant 10 minutes. Le fragment d'ADN ainsi résulté a été précipité à l'éthanol, puis utilisé dans la réaction de ligation.

IV. 4. Introduction d'ADN dans une bactérie

IV. 4. 1. Transformation des cellules d'*E. coli* (Chung et al., 1989)

Principe

Depuis 1970, il est connu que des bactéries traitées avec une solution de CaCl₂ froid, puis soumises à un bref choc thermique sont en état de compétence transitoire qui leur permet « d'ingérer » de l'ADN étranger (phage, plasmide). Le protocole permet d'obtenir 10⁸ à 10⁹ colonies transformées par µg d'ADN de plasmide superenroulé, en soumettant des souches d'*E. coli* à des cocktails de cations divalents (Ca²⁺, Mg²⁺, etc), au DMSO et au chlorure d'hexamine cobalt. Le mode d'action de ces agents, tout comme le mécanisme de pénétration de l'ADN du plasmide dans la bactérie ne sont pas connus.

IV. 4. 1. 1. Transformation par choc thermique (kit Invitrogen)

Les cellules compétentes d'*E. coli* DH5α conservées à -70°C sont décongelées sur la glace. Le plasmide contenant l'insert d'intérêt est rajouté dans le tube contenant les cellules compétentes, en quantité appropriée (de 0,1 à 1µg d'ADN). L'incubation sur la glace poursuivie pendant 30 minutes. Le tube contenant le mélange de transformation est ensuite incubé à 42°C pendant 30 secondes, puis placé sur la glace. On ajoute ensuite un volume de 250 µL de milieu riche (SOC). La culture est incubée pendant une heure dans un bain marie réglé à 37°C, puis étalée sur milieu solide comme décrit précédemment.

IV. 4. 1. 2. Transformation à l'aide du tampon TSS

A partir d'une préculture de la souche à transformer, on inocule au 1/100, 5 mL de milieu LB. La croissance est arrêtée à DO₆₀₀=0,35. La culture est centrifugée 10 minutes à 6000 g, le culot bactérien est remis en suspension dans 0,5 mL de tampon TSS (milieu LB additionné de PEG 4000, 10% ; MgCl₂, 10mM ; MgSO₄, 10 mM et de DMSO, 5%). Les cellules sont incubées 10 minutes sur la glace, puis aliquotées par volume de 100 µL. Ensuite, à 100 µL de suspension bactérienne est ajouté l'ADN en quantité appropriée (de 0,1 à 1 µg). L'incubation sur la glace est poursuivie 20 minutes. On ajoute ensuite 0,9 mL de tampon TSS. Les bactéries transformées sont incubées à 37°C pendant une heure, afin que les gènes plasmidiques de résistance aux antibiotiques soient exprimés. Cette culture est alors étalée sur boîte de Pétri contenant le milieu LB solide et l'antibiotique adéquat.

IV. 4. 1. 3. Sélection des clones positifs. L'α complémentation : la β-galactosidase

La β-galactosidase, codée par le gène *lacZ* d'*E.coli*, catalyse le clivage des β-galactosides (X-Gal, lactose), libérant le galactose contenu dans le substrat. Par exemple, le X-Gal incolore est clivé par la β-galactosidase en 5-bromo-4-chloro-3-indolyl (de couleur bleue)

et en galactose. L'IPTG sert d'inducteur de l'expression du gène *lacZ*. Les cellules présentant une activité β -galactosidase sont de couleur bleue sur milieu LB+X-Gal+IPTG, les autres sont blanches.

IV. 4. 2. Transformation des cellules de *Bifidobacterium longum* par choc électrique (électroporation) (Rossi *et al.*, 1992)

IV. 4. 2. 1. Principe

L'électroporation est une méthode générale pour introduire des gènes clonés dans une cellule. Une suspension de cellules et d'ADN transformant (plasmide) sont soumis à une décharge électrique de haut voltage qui apparemment crée des trous ou des pores dans la membrane cellulaire. Ceux-ci permettent le passage de macromolécules telles que l'ADN. Cette technique est applicable à des nombreux types cellulaires, dont ceux réfractaires aux techniques classiques de transformation (Procaryotes) ou transfection (Eucaryotes). L'électroporation est effectuée au froid car la membrane se réorganise plus lentement à basse température.

IV. 4. 2. 2. Préparation des cellules compétentes de *Bifidobacterium longum*

Les cellules de *B. longum* sont cultivées pendant une nuit (16 heures) en 5 mL de milieu MRS contenant du chlorhydrate de cystéine (CysHCl)(0,05%) et du glucose (0,2%). A partir de cette préculture, 20 mL de milieu MRS-CysHCl sont inoculés au 1/25. La croissance est arrêtée à $DO_{600nm} = 0,3$ à $0,4$ par incubation sur glace pendant 10 à 20 minutes. La culture est centrifugée pendant 10 minutes à 8000 g, le culot bactérien est lavé deux fois à 4°C en utilisant une solution tampon de lavage (saccharose, 0,5 M ; tampon citrate 1 mM, pH 6). De cette façon, la force ionique de la suspension bactérienne est réduite par plusieurs lavages en tampon à faible concentration saline, mais permettant la survie des cellules. Le culot bactérien est remis en suspension dans 100 μ L de tampon de lavage préalablement refroidit à 4°C. L'incubation sur la glace est poursuivie pendant 30 minutes. Les cellules sont ensuite stockées à -80°C dans le même tampon additionné de glycérol (10%).

IV. 4. 2. 3. Transformation des cellules compétentes de *B. longum* par électroporation

Les cuves d'électroporation (BioLabs) sont préincubées à -20°C avant utilisation. Puis, dans chaque cuve, à 50 μ L de cellules compétentes est ajouté le vecteur (environ 1 μ g d'ADN) dialysé. Le plasmide portant le fragment d'ADN d'intérêt est ensuite introduit dans la cellule par transformation par arc électrique. L'électroporation a lieu selon les paramètres suivants : 25 μ F, 200 Ω , 2 kV (Electro Cell Manipulator[®] 600, BTX, Genetronics, Inc., USA). On rajoute ensuite stérilement 800 μ L de milieu MRS-CysHCl.

Les bactéries ainsi transformées sont incubées pendant 3 heures à 37°C, afin que le gène plasmidique de résistance à l'antibiotique soit exprimé. Cette culture est ensuite étalée sur boîte de Pétri contenant du milieu MRS-CysHCl agar contenant l'antibiotique adéquat. Les boîtes de Pétri sont incubées pendant deux à trois jours en milieu anaérobie, à 37°C. Des essais d'électroporation utilisant les cellules sans plasmide et les cellules avec le plasmide pDG7 sans insert ont servi de témoin.

IV. 5. Techniques d'hybridation moléculaire. Transfert d'ADN sur membrane de Nylon (Southern blot)

IV. 5. 1. Principe

Mise au point par Southern (1975), cette technique permet, grâce à un flux de tampon créée par un gradient d'imbibition, de transférer différents fragments d'ADN séparés par électrophorèse en gel d'agarose sur une membrane de nylon. L'efficacité du transfert dépend de la taille des fragments d'ADN et de la concentration en agarose du gel. Pour obtenir un meilleur transfert des grands fragments, l'ADN est partiellement hydrolysé en fragments d'environ 1 kb juste avant le transfert par capillarité. Pour cela, l'ADN est partiellement dépuriné sous l'action d'un acide peu concentré (HCl, 0,25M), puis clivé par l'action d'une base forte (NaOH, 0,4 M) qui hydrolyse la chaîne d'ADN aux sites de dépurination. Le transfert d'ADN se fait sur une membrane de Nylon Hybond N⁺ (Amersham-Pharmacia).

IV. 5. 2. Mode opératoire

IV. 5. 2 1. Préparation de l'ADN

Environ 40 µg d'ADN_g de *B. longum* sont digérés totalement par la ou les endonucléases adéquates (*Bam*HI, *Hind*III ou *Eco*RV) dans les tampons et les conditions appropriés (Roche Diagnostics et Biolabs). L'efficacité des digestions enzymatiques est contrôlée en déposant 100 ng de produit de digestion sur un minigel d'agarose à 0,7%.

L'ADN ainsi digéré est déposé en totalité sur un gel d'agarose (à 0,7%) et l'électrophorèse est effectuée en TBE 1X sous voltage constant de 80V. Le gel est ensuite incubé pendant 30 minutes avec du HCl 0,25 M, afin de réaliser la dépurination de l'ADN. Cette étape facilitera le transfert des fragments d'ADN de grande taille sur la membrane de nylon. Le gel est ensuite transféré dans une solution de dénaturation (NaOH, 0,5M; NaCl, 1,5 M), deux fois pendant 15 minutes.

Le transfert de l'ADN du gel sur une membrane de nylon chargée positivement (Hybond N⁺, Amersham Pharmacia) est réalisé par capillarité en solution SSC 2X (NaCl, 0,3M ; citrate de sodium, 0,03M ; pH 7) pendant une nuit , sous un poids d'environ 800 g. La membrane est rincée par du SSC 2X et l'ADN est fixé par cuisson dans un four à 120°C pendant 30 minutes.

IV. 5. 2. 3. Préparation de la sonde pour hybridation

Le fragment d'ADN sonde à marquer est isolé selon la méthode décrite dans le paragraphe IV. 3. 3. Le marquage se fait par amplification par PCR utilisant un mélange de cinq déoxynucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, tous à 0,65 mM et dUTP à 0,35 mM) dont l'UTP est marqué à la digoxygénine (DIG-11-dUTP) (Roche Diagnostics). La sonde est ensuite précipité à l'alcool afin d'éliminer les nucléotides non incorporés.

IV. 5. 2. 4. Hybridation ADN-ADN avec la sonde marquée

Avant l'hybridation proprement dite, la membrane est saturée avec un ADN non spécifique ne donnant pas d'hybridation avec la sonde. L'ADN le plus souvent utilisé est celui de sperme de hareng ou de saumon [ou une solution de blocage à 10% (p/v), Roche Diagnostics].

La membrane est préhybridée à 42 °C sous agitation pendant une heure dans 25 mL de tampon de préhybridation [formamide, 12,5 mL; SSC 20X, 6, 25 mL; N-lauryl sarcosine à 10% (p/v), 0, 25 mL; SDS à 10% (p/v), 0,05mL; solution de blocage à 10% (p/v), 5mL; H₂O UHQ, 1 mL].

L'hybridation se réalise dans une solution de préhybridation fraîche, à laquelle est ajoutée la sonde marquée (10 à 20 ng de sonde marquée), dénaturée par chauffage à 95°C pendant 3 minutes et refroidissement immédiat dans la glace. L'hybridation se fait durant une nuit à 42°C, sous agitation, dans un four à hybridation (Apligène).

Le lendemain la membrane est lavée à deux reprises par une solution [SSC 2X ; SDS, 0,1%] à la température ambiante. Deux lavages par du (SSC 0,1X ; SDS, 0,1%) à 68°C sont ensuite effectués.

IV. 5. 2. 5. Détection de la sonde marquée par la digoxygénine par chimioluminescence (DNA-Labeling and Detection kit, Roche)

IV. 5. 2. 5. 1. Principe

La détection de la digoxygénine est une réaction immunochimique. Après hybridation, la sonde marquée à la digoxygénine est détectée grâce à un anticorps antidigoxygénine couplé à la phosphatase alcaline. La phosphatase alcaline déphosphoryle un substrat chimioluminescent (le CSPD) et va libérer un composé instable émetteur de lumière (de photons), ce qui va permettre d'impressionner un film de radiographie au rayons X.

IV. 5. 2. 5. 2. Mode opératoire

La détection de la sonde marquée à la digoxygénine est réalisée suivant les instructions du kit de détection (Roche). Brièvement, la membrane de nylon est lavée à deux reprises dans un tampon de lavage [maléate 0,1M, pH 7,5 ; NaCl 0,15 M ; Tween 20 0,3% (v/v)] pendant 2 à 5 minutes, puis saturée par une solution de saturation (maléate, 0,1M, pH 7,5 ; NaCl 0,15 M ; agent bloquant, 1%) pendant 30 minutes. La membrane est incubée pendant 30 minutes avec les fragments Fab d'un sérum polyclonal de mouton anti-DIG couplés à la phosphatase alcaline, dilués au 1/5000^e dans ce même tampon. Après trois lavages de 10 minutes, la membrane est incubée dans le tampon de détection (Tris-HCl 0,1M, pH 9,5 ; NaCl 0,1M ; MgCl₂ 50 mM). Le CDP-StarTM (Roche Diagnostics) est un substrat chimioluminescent déphosphorylé par la phosphatase alcaline. La membrane est mise en contact pendant 5 à 15 minutes avec ce substrat dilué au 1/100^e dans le tampon de détection, puis exposée contre un film photographique (MR, Kodak).

IV. 6. Séquençage de l'ADN

Le séquençage des inserts est réalisé selon la technique de terminaison de chaînes (Sanger *et al.*, 1977), à l'aide de l'AutoRead™ Sequencing Kit (Amersham Pharmacie Biotech).

Les amorces de séquençage "Universal Primer M13-20" et "Reverse Primer" (4 à 10 pmoles), couplées en 5' au fluorochrome CyTM5Amidite (indodicarbocyanine) s'apparient avec la matrice d'ADN à 65°C pendant 5 min, à 37°C pendant 10 min et à la température ambiante pendant 10 min. Si des amorces non fluorescentes spécifiques de l'insert sont utilisées (5 pmoles), une courte élongation de 5 min à 37°C est réalisée. La T7 ADN polymérase (6 unités) effectue le marquage interne par incorporation de Cy5-dATP et de trois autres dNTPs (Cy5-dATP Labelling mix, Amersham Pharmacia Biotech). L'élongation et la terminaison des chaînes sont réalisées en présence de DMSO. La T7 ADN polymérase est ajoutée à ce moment pour le séquençage par les amorces fluorescentes. Le mélange réactionnel est réparti dans quatre tubes, chacun d'eux contenant 1mM des quatre dNTPs et 5µM d'un des quatre ddNTPs. Ces concentrations sont adaptées à un arrêt de la polymérisation par les didésoxynucléotides à toutes les positions possibles des chaînes d'ADN en synthèse. Les tubes sont incubés à 37°C pendant 5 min et les réactions d'élongation sont arrêtées par ajout d'une solution formamide 100%- Bleu Dextran 2000 5mg/mL.

Les échantillons sont dénaturés à 95°C pendant 3 min avant d'être déposés sur un gel dénaturant (urée 7M) à 6% d'acrylamide/bisacrylamide (19:1) (Biorad) préparé en TBE 0,6X, polymérisé par du persulfate d'ammonium 0.035% (p/v) et du TEMED 0.0875% (v/v). L'électrophorèse est réalisée sur un séquenceur "Automated Laser Fluorescent ALFExpress™ DNA sequencer" (Pharmacia Biotech), en TBE 0,6X à 1500V et 60mA, à la température constante de 55°C. Les photodétecteurs repèrent le passage des fragments d'ADN marqués au Cy5 devant le laser (667 nm). Le logiciel ALF™ win 10.1 convertit les signaux de fluorescence et génère les nucléotides.

V. Méthodes biochimiques

V. 1. Caractérisation du produit d'un gène par le système T7 ARN polymérase

V. 1. 1. Principe

Dans un grand nombre des cas, la synthèse *in vivo* des protéines recombinantes ralentit ou inhibe la croissance des bactéries. Un système d'expression optimal et, par définition, celui qui permet de supprimer ou de réduire le taux de base de synthèse de la protéine recombinante hors induction. Le système pET (Novagen) permet à l'utilisateur d'introduire plusieurs points de contrôle.

Un gène cloné dans un vecteur de la famille pET est sous le contrôle du promoteur T7. L'ARN polymérase des bactéries hôtes ne se fixe pas sur ce promoteur et ne peut donc pas transcrire le gène cible. Pour la production de la fructokinase recombinante nous avons utilisé des cellules lysogènes DE3, dont le génome aura intégré une copie du gène DE3 codant pour l'ARN polymérase T7 qui est spécifique du promoteur T7. Sa synthèse, régulée par le

promoteur *lacUVR5*, est réprimée par le répresseur LacI. Elle sera induite par l'addition de l'IPTG dans le milieu de culture.

Cependant, ce système n'empêche pas un taux d'expression basale résiduel du gène codant pour la protéine recombinante.

Un contrôle encore plus rigoureux est possible en clonant le gène cible dans le plasmide pET 28 a(+). L'expression du gène est alors sous le contrôle du promoteur T7*lac* qui contient un site de fixation pour le répresseur LacI. Ces vecteurs possèdent leur propre copie du gène *lacI*, afin d'assurer une concentration intracellulaire de répresseur LacI élevée.

V. 1. 2. Mode opératoire

V. 1. 2. 1. Obtention du plasmide d'expression pFrK2

Le vecteur d'expression pET 28 a(+) permet l'expression chez *E. coli* d'une protéine en fusion avec un peptide hexahistidine en position carboxy- ou amino- terminale. Une purification par IMAC (Immobilized-Metal Affinity Chromatography) de la protéine recombinante est alors possible.

1) Amplification et clonage de l'ORF. Obtention du plasmide pFrK1.

L'ORF complet codant pour la fructokinase (FrK) est obtenu par PCR. La PCR est réalisée avec le couple d'amorces FrK_{ATG}/FrK_{TAA} (cf. paragraphe IV. 2. 3. 2.). Les produits de PCR sont élués d'un gel d'agarose et clonés dans le vecteur pCR2.1 (Invitrogen). Les bactéries recombinantes sont criblées, les plasmides (pFrK1) des clones positifs sont extraits et leur insert est séquencé complètement afin de vérifier la séquence des ORF.

Une deuxième PCR est ensuite réalisée utilisant le couple d'amorces FrK_{NdeI}/ FrK_{BamHI} et l'ADN_g de *B. longum* A10C comme matrice. Ces deux amorces portent les sites de restriction qui faciliteront le clonage ultérieur dans le vecteur d'expression.

2) Sous- clonage dans le vecteur d'expression pET28 a(+)

Environ 5µg de produit d'amplification obtenu lors de cette deuxième PCR sont digérés par les endonucléases de restriction *BamHI* et *NdeI*, pendant deux heures à 37°C. En parallèle, 2 µg de vecteur pET 28 sont linéarisés par les enzymes de restriction *BamHI* et *NdeI*.

Les produits de digestion sont déposés sur gel d'agarose 0,7%. Après une migration d'une heure à 60V, les fragments de 894 pb (correspondant à l'ORF complet de la FrK) et de 5,4 kb (correspondant au plasmide pET 28 linéarisé) sont élués.

La ligation du vecteur et de l'insert est réalisée par 1µL de T4ADN ligase (1U/µL) à 16°C pendant une nuit. Les constructions servent à transformer les bactéries compétentes *E. coli* BL21 (DE3). Le plasmide contenu dans chaque clone est extrait (cf § IV. 1).

Puis, la présence et la taille de l'insert sont vérifiées par digestion enzymatique. La nature de l'insert est subséquentement vérifiée par PCR. Les bactéries sont ensuite sélectionnées pour leur capacité à synthétiser la protéine recombinante FrK.

V. 1. 2. 2. Expression et purification de la protéine recombinante

1) Induction de la synthèse de la protéine recombinante

L'expression de la protéine recombinante par les cellules d' *E. coli* BL21 (DE3) est induite lorsque la culture bactérienne en milieu LB-Amp présente une $DO_{600nm} = 0.5$ à 0.8 , par addition d'isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside (IPTG) aux concentrations de $1mM$ (après 2 à 4 heures de culture à $37^{\circ}C$). Les bactéries sont alors récoltées par centrifugation et les culots sont conservés à $-20^{\circ}C$ jusqu'à utilisation.

2) Préparation du lysat cellulaire bactérien

Le culot bactérien contenant la protéine recombinante (correspondant à 200 mL de culture) est repris par 5 mL de tampon PBS (phosphate de sodium, $50mM$, pH 8; NaCl, $300mM$). La lyse cellulaire est réalisée par sonication 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:	$4^{\circ}C$

Ce traitement est effectué trois fois avec une pause de 5 minutes entre chaque traitement. La suspension est ensuite centrifugée 15 minutes à $45000 g$ à $4^{\circ}C$. Les surnageants sont récoltés et le taux des protéines solubles est dosé comme décrit ci-dessous.

3) Dosage des protéines solubles

Le dosage des protéines solubles est effectué par la technique de Bradford (1976). Le kit utilisé est commercialisé par Bio-Rad. Le réactif permettant le dosage contenant entre autres de l'acide sulfurique et du bleu de Coomassie. Ce dernier existe sous trois formes : anionique (bleu, $\lambda_{max}=470 nm$), neutre (vert, $\lambda_{max}= 650 nm$) et cationique (rouge, $\lambda_{max}= 470 nm$). La forme anionique se fixe préférentiellement sur les protéines. La méthode de Bradford est donc basée sur le déplacement du maximum d'absorption (de $\lambda=470 nm$ à $\lambda=595 nm$) d'une solution acide de bleu de Coomassie G-250 lorsque ce colorant se fixe aux protéines.

Le dosage se fait par lecture au spectrophotomètre ($\lambda=595 nm$), 5 à 30 minutes après le mélange de $980 \mu L$ de réactif et de $20 \mu L$ de solution protéique à analyser. La concentration en protéines est calculée par comparaison avec une courbe étalon réalisée en parallèle avec le dosage. Cette courbe est tracée utilisant des solutions de BSA (la serum

albumine bovine) de concentrations différentes. Ces solutions sont obtenues par dilutions successives d'une solution mère de BSA de concentration connue.

4) Purification de la protéine recombinant par chromatographie d'affinité

La totalité du surnageant est chargée sur une colonne TALON (Co²⁺) équilibrée en préalable par le tampon de PBS. La résine est lavée par 50mL (10 volumes de colonne) de tampon PBS. L'élution est réalisée par une solution contenant de l'imidazole 150 mM dans du tampon PBS. Les fractions d'élution de 2 mL sont conservées à +4°C.

La protéine recombinante purifiée est analysée par SDS-PAGE. Elle est ensuite utilisée pour la détermination de ses paramètres biochimiques.

V. 1. 2. 3. Séparation électrophorétique des protéines sur gel de polyacrylamide-SDS (SDS-PAGE)

V. 1. 2. 3. 1. Principe

Ce système permet une séparation des protéines essentiellement en fonction de leur poids moléculaire. En effet, les protéines sont traitées au préalable par le SDS et le β -mercaptoéthanol et chauffées à 95°C pendant 2 minutes. Ce traitement permet la dissociation des sous-unités des protéines oligomériques. De plus, les chaînes peptidiques (les monomères) prennent toutes une charge électrique identique par adsorption d'un certain nombre d'ions dodécylsulfate. La mobilité électrophorétique de ces complexes protéine-SDS dépend donc uniquement du poids moléculaire des monomères, qui est alors déterminé par comparaison à la mobilité de protéines étalons (témoins de masse moléculaire protéiques).

V. 1. 2. 3. 2. Préparation des échantillons

Les échantillons sont dilués deux fois dans une solution de dépôt (Tris-HCl, 100 mM pH 6,8 ; glycérol, 30% ; SDS, 4% ; 2- β -mercaptoéthanol, 100 mM ; bleu de bromophénol, 0,05%). Le tampon de migration (10X) est constitué de Tris base, 3% ; glycolcolle, 14% ; SDS, 1%.

V. 1. 2. 3. 3. Préparation du gel d'électrophorèse

Un gel de séparation est coulé entre deux plaques de verre sur une hauteur d'environ 15 centimètres pour 1 mm d'épaisseur. Le gel est recouvert d'eau pour assurer la planéité de sa surface. Un gel à 12% est constitué de 6,7 mL d'eau; 5 mL de Tris-HCl, 1,5 M pH 8,8 ; 0,2 mL SDS, 10% ; 8 mL acrylamide/bisacrylamide (30%/0,8%); 100 μ L persulfate d'ammonium ; 10 μ L TEMED. Après polymérisation, l'eau est éliminée et la surface du gel est séchée.

Le gel de concentration est alors coulé sur une hauteur de 1 centimètre et surmonté d'un peigne qui sera ôté après polymérisation. Il est composé de 12,2 mL d'eau ; 5 mL Tris-HCl, 0,5 M pH 6,8 ; 200 μ L SDS 10% ; 2,6 mL acrylamide/bisacrylamide (30%/0,8%); 100 μ L persulfate d'ammonium 10% ; 20 μ L TEMED.

V. 1. 2. 3. 4. Dépôt des échantillons et migration des protéines dans le gel

Après rinçage des puits, 10 μ L à 20 μ L d'échantillons sont déposés. Pour un gel de 1 mm épaisseur, la migration s'effectue à 25 mA pour le gel de concentration et à 35 mA pour le gel de séparation.

V. 1. 2. 3. 5. Coloration et décoloration du gel

La coloration du gel s'effectue au bleu de Coomassie. Après migration, le gel est trempé pendant 10 minutes à une heure, selon besoin, dans une solution de bleu de Coomassie : bleu de Coomassie, 0,2% dans l'eau, 50 mL; éthanol, 40 mL ; acide acétique, 10 mL. La décoloration se fait dans plusieurs bains d'une solution d'acide acétique (10%) et de éthanol (20%) dans l'eau, avec agitation. A 50°C, la décoloration est plus rapide.

Le gel est ensuite enveloppé entre deux feuilles de cellophane, puis placé dans un sécheur de gel sous vide pendant 2 à 3 heures à 60°C.

V. 1. 2. 4. Mesure de l'activité fructokinase de la protéine FrK

Deux techniques nous ont permis de mesurer l'activité fructokinase de la protéine FrK de *B. longum* A10C.

V. 1. 2. 4. 1. Méthode colorimétrique (Sebastian et Asensio, 1972)

Principe

La méthode colorimétrique de dosage de l'activité de la fructokinase de *B. longum* utilisée dans ce travail est celle décrite par Sebastian et Asensio (1972). Cette technique utilise une méthode couplée à deux enzymes (la phosphoglucose isomérase et la glucose-6-phosphate deshydrogénase) et mesure l'apport de NADPH au cours du temps. Le fructose-6-phosphate (F6P) formé à partir de fructose sous l'action de la fructokinase est isomérisé en glucose-6-phosphate (G6P) par la phosphoglucose isomérase (PGI). La quantité de G6P formée est mesurée en reliant à la quantité de NADP réduit par la glucose-6-phosphate deshydrogénase (G6PDH) lors de la production de l'acide 6-phosphogluconique. La cinétique de formation de NADPH est suivie à 340 nm à l'aide d'un spectromètre (Shimadzu).

Cette méthode a été utilisée lors de l'analyse des paramètres enzymatiques de la protéine FrK purifiée.

Mode opératoire

La composition du mélange réactionnel (200 μ L) est la suivante : D-fructose (2,7 mM), ATP (10 mM), MgCl₂ (5 mM) et du tampon PBS (pH 6,5). Après une préincubation de 5 minutes à 50°C, la réaction enzymatique est déclenchée par l'ajout de 2,5 μ g de fructokinase purifiée. Après 5 minutes, la réaction est stoppée par chauffage à 80°C. Pour

mesurer la quantité de F6P formé, du NADP⁺ (3 mM), de la PGI (0,2 U), de la G6PDH (1 U) et du tampon Tris-HCl (100 mM, pH 7,8) sont additionnés et la réaction est poursuivie à température ambiante pendant 10 minutes. La quantité de NADPH formé est détectée par mesure de l'absorbance de la solution à $\lambda=340$ nm.

L'activité enzymatique spécifique ainsi mesurée est exprimée en μ moles de F6P formé par minute et par μ g de protéine à 37 °C.

V. 1. 2. 4. 2. Méthode chromatographique (HPAEC-PAD)

Principe

La séparation, l'identification et la quantification des produits de phosphorylation des hexoses (D-fructose ou D-glucose) par l'extrait cellulaire de *B. longum* a été réalisée par chromatographie d'échange d'anions à haut pH (HPAEC) couplée à une technique de détection par ampérométrie en champs pulsé (PAD, *pulsed amperometric detection*).

Cette technique permet l'élution des anions en ordre décroissant de leur pKa. Brièvement, après adsorption sur une colonne échangeuse d'anions, les monosaccharides, neutres ou phosphorylés, sont ionisés. L'ionisation des monosaccharides est effectuée par passage d'une phase mobile à haut pH (NaOH, pH>12). Dans ces conditions, les monosaccharides vont se dissocier en tant qu'oxanions. Lorsque les fonctions hydroxyle des monosaccharides sont substituées par des fonctions acides (phosphate, carboxyle, sulfate), les interactions avec la résine échangeuse d'anions sont plus importantes et l'élution s'effectue alors en gradient d'acétate de sodium.

Les produits élués sont ensuite oxydés sur une électrode (anode) en or (Au), conduisant au CO₂, H₂O et AuO. L'oxyde d'or (AuO) est ensuite réduit (à la cathode) en Au. Lorsque un courant électrique de potentiel constant est appliqué aux électrodes, la variation de l'état d'oxydation de l'électrode en Au est détectée et mesurée par un détecteur ampérométrique. Deux paramètres caractérisent donc le signal mesuré par le détecteur : le temps de rétention et l'amplitude du signal. Le temps de rétention (t_R) est mesuré par rapport au moment de l'injection de l'échantillon. L'amplitude du signal est proportionnelle avec la quantité d'AuO formé, donc avec la quantité de monosaccharide oxydé.

Dans ce travail, cette technique de détection a été utilisée pour deux types d'analyses :

i) Analyse qualitative du profil de phosphorylation du D- fructose et du D-glucose par l'extrait cellulaire de *B. longum*. Cela nous a permis d'identifier la voie de la F6PPK comme étant la voie de fermentation du fructose chez *B. longum* A10C. Cette approche nous a également permis d'observer l'absence d'activité fructokinase dans l'extrait cellulaire de *B. longum* DSM20219.

ii) Analyse quantitative du profil de phosphorylation du fructose par l'extrait enzymatique de *B. longum* A10C. Par cette technique nous avons pu mettre en évidence la variation du taux de biosynthèse de la protéine FrK en fonction de la source de carbone présente dans le milieu de culture de *B. longum* A10C.

Mode opératoire

1) Mélange réactionnel utilisé lors de l'analyse de la phosphorylation du D-fructose par la fructokinase de *B. longum*

Le mélange réactionnel (saccharide, 1 g/L ; tampon imidazole 25 mM, pH 6,5 ; MgCl₂, 5 mM ; ATP, 10 mM) est préincubé pendant 5 minutes à 37 °C. La réaction enzymatique est déclenchée par l'ajout de 2,5 à 10 µg de protéines solubles provenant de l'extrait cellulaire de *B. longum*. Après 5 minutes, la réaction est stoppée par chauffage à 80°C et les produits sont filtrés sur une membrane Millipore de porosité 0,22 µm. Le mélange réactionnel ainsi filtré est analysée par HPAEC-PAD.

2) Analyse et identification des produits de phosphorylation

Les saccharides sont séparés sur une colonne Carbobac PA-100 (4x250mm, Dionex) conditionnée en soude 50 mM. La chromatographie est développée à un débit de 1 mL/min en utilisant un gradient d'acétate de sodium (NaOAc) dans du NaOH (0,1 M): 0-5 minutes, 0 M ; 5-25 minutes, 0-0,5M ; 25-30 minutes, 0,5-1M. Les produits phosphorylés formés sont élués en ordre croissant de leur charge négative.

Les différents pics obtenus sont identifiés utilisant des standards (D-glucose, D-fructose, F6P, G6P, S7P, F1P, G1P, F-1,6-P).

3) Analyse de la variation de l'activité fructokinase en fonction de la source de carbone présente dans le milieu de culture

3). 1. Gamme étalon

Une gamme étalon de solutions de F6P (5µg/mL, 10µg/mL ; 50µg/mL ; 100µg/mL) et de G6P (5µg/mL, 10µg/mL ; 50µg/mL ; 100µg/mL) réalisées dans le tampon d'incubation nous a permis de convertir la surface des pics associés au G6P et au F6P avec la quantité détectée (en µg) de G6P et de F6P, respectivement.

3). 2. Préparation du lysat cellulaire des trois différents types de cultures de *B. longum* A10C

L'analyse de l'influence de la source de carbone sur le taux de biosynthèse de la protéine FrK a été réalisée de la manière suivante. Les cellules de *B. longum* A10C ont été cultivées dans le milieu de Garches contenant une seule source de carbone (voir aussi paragraphe II. 1. 2, page 78). Le milieu de Garches est un milieu semi synthétique qui ne permet pas la croissance des bifidobactéries sans l'ajout d'une source de carbone. Dans notre expérience, cette source de carbone est constituée d'un monosaccharide, glucose ou fructose (2 g/L) ou d'un mélange équimolaire de ces deux saccharides (glucose, 1 g/L ; fructose 1 g/L).

Après 16 heures de croissance, les trois types de cultures de *B. longum* A10C ont été analysés. La biomasse formée a été ensuite estimée par analyse de la quantité de protéines solubles mesurées dans l'extrait cellulaire. La quantité de substrat utilisé et

l'activité fructokinase de l'extrait cellulaire de chaque type de culture ont été subséquentement mesurés.

3). 3. Définition de l'unité d'activité enzymatique

Lorsque le fructose est incubé avec l'extrait cellulaire de *B. longum* A10C, le F6P ainsi formé est rapidement isomérisé en G6P par l'enzyme glucose-6-phosphate isomérase présente dans le lysat cellulaire bactérien. Par conséquent, lors des expériences nécessitant l'utilisation de l'extrait cellulaire de *B. longum* et non pas la fructokinase purifiée, nous avons estimé que la quantité de F6P formé à partir du fructose représente la somme des quantités de F6P et de G6P mesurées. Par conséquent, dans cette partie de notre étude, l'activité spécifique de la fructokinase de *B. longum* a été exprimée en μ moles de hexoses phosphorylés (F6P+G6P) par minute et par μ g de protéine, à 37 °C.

V. 5. Analyse des paramètres biochimiques de la protéine FrK

V. 5. 1. Détermination de la concentration en enzyme

Des dilutions sériées dans l'eau de protéine enzymatique recombinante sont réalisées. L'activité enzymatique est dosée dans les conditions décrites ci-dessus et la concentration en enzyme est déterminée lorsque la vitesse initiale de réaction est proportionnelle à la concentration en enzyme.

V. 5. 2. Détermination du pH optimal et de la température optimale

L'optimum d'activité a été déterminé dans les conditions décrites ci-dessus, en faisant varier respectivement le pH du tampon (de 3 à 9) ou la température (de 6°C à 60°C).

V. 5. 3. Analyse de la spécificité de substrat

i) spécificité pour le substrat saccharidique

La spécificité de la fructokinase de *B. longum* A10C pour le substrat saccharidique a été analysée par chromatographie en couche mince (CCM) et par chromatographie d'échange d'anions à haut pH (HPAEC-PAD).

Les différents substrats saccharidiques analysés (trois hexoses : D-glucose, D-fructose, D-mannose ; trois pentoses : D,L-arabinose, L-arabinose, D-xylose ; un disaccharide, le saccharose) ont été incubés dans les conditions décrites ci-dessous et déposés sur plaque couverte de gel de silice (Silica Gel, Merk, Darmstadt) en raison de 5 μ g de saccharide par piste. La séparation des produits a été effectuée utilisant le mélange de solvants : butanol/acide acétique/eau [2/2/1 (v/v)]. Les saccharides ont été visualisés après pulvérisation des plaques avec une solution d'orcinol sulfurique et chauffage à 120°C pendant 2 à 4 minutes. Les monosaccharides phosphorylés ont été identifiés à l'aide des standards : G6P, F6P, S7P, mannose-6-phosphate, arabinose-5 phosphate et xylose-5- phosphate (Sigma).

Les produits formés lors de l'incubation de la protéine FrK en présence de glucose, de fructose et de mannose ont également été analysés par HPAEC-PAD.

ii) spécificité pour le substrat nucléotidique

La capacité de cinq nucléoside triphosphates (ATP, GTP, ITP, CTP, TTP) à transférer, dans une réaction catalysée par la protéine FrK, le résidu γ -phosphate au D-fructose est analysée par la méthode colorimétrique décrite dans le paragraphe V. 1. 2. 4. 1, page 94. Chaque NTP est utilisé à une concentration de 10 mM.

V. 5. 4. Paramètres cinétiques

Les paramètres cinétiques K_M et V_M sont déterminés en utilisant une gamme de concentrations de fructose-6-phosphate et la représentation linéaire de Hanes et Wolf. L'équation $[S]/V = [S]/V_M + K_M/V_M$ nous a permis de déterminer à partir du graphique la valeur $1/V_M$ (la pente) et le rapport K_M/V_M (l'intercepte avec l'ordonné).

V. 5. 5. Détermination de la température de dénaturation

L'enzyme est incubée dans le tampon sans substrat pendant 15 min dans un bain – marie à la température voulue (de 6 à 80°C). L'activité résiduelle est suivie à $\lambda = 340$.

V. 6. Détermination du taux d'incorporation du fructose par *B. longum*

Principe

Les cellules de *B. longum* provenant d'une culture de 16 heures en milieu TPY sont incubées pendant des temps variables (de 0 à 8 minutes) en présence de fructose radiomarqué. 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 imidazole froid (pH 7) pour éliminer toute la radioactivité non incorporée par le microorganisme.

Le fructose utilisé a été obtenu chez Sigma. Le fructose radiomarqué a une activité spécifique de 1,46 mCi/mmol (D-[U- ^{14}C] fructose ; Amersham).

Mode opératoire

Un volume de 20 mL de culture bactérienne est centrifugé à 2500 g, 10 minutes à 15°C. Le culot est remis en suspension dans le tampon imidazole 25 mM, pH 7, préalablement dégazé et centrifugé dans les mêmes conditions. Les bactéries sont ensuite homogénéisées dans 1,8 mL du même tampon. La suspension bactérienne obtenue est préincubée 5 minutes à 39°C. Ensuite, un volume de 200 μL de solution contenant les saccharides est rajouté. Des prélèvements (200 μL) sont effectués à 1, 2, 5 et 8 minutes. Les cellules ainsi prélevées sont filtrées sur des membranes de 0,22 μm (Millipore) et lavées par 5 mL du même tampon froid. Les filtres sont séchés, puis transférés dans 4mL de liquide scintillant (Lipoluma). 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 μCi fructose. Les résultats obtenus sont la moyenne d'au moins trois expériences séparées.

V. 7. Détermination du taux d'utilisation du fructose par *B. longum*

Généralités

Les cellules de *B. longum* A10C ont été cultivées dans le milieu de Garches contenant une seule source de carbone, glucose ou fructose (2 g/L), ou un mélange équimolaire des deux hexoses (glucose, 1 g/L ; fructose, 1 g/L). Après 8 et 16 heures de culture, les cellules ont été récupérées par centrifugation et la quantité de protéines solubles présentes dans chaque type de culture a été mesurée. La quantité de monosaccharide restant dans le milieu de culture a été mesurée à l'aide du kit de dosage « D-glucose/D-fructose » (Roche).

Le protocole de dosage des deux hexoses est celui recommandé par le fournisseur. Brièvement, les molécules de hexose (D- glucose ou D-fructose) sont phosphorylées en position 6 par une hexokinase. Le fructose-6-phosphate est isomérisé en glucose-6-phosphate par l'enzyme PGI. Le glucose-6-phosphate formé est alors oxydé par l'enzyme G6PDH en acide 6-phosphogluconique. La production de NADPH qui en découle est estimée par lecture de l'absorbance à $\lambda = 365$ nm.

V. Méthodes de bioinformatique

Afin d'identifier chaque fragment d'ADN cloné, sa séquence est comparée en format FASTA avec les séquences disponibles dans les banques de données par le programme BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, National Institute of Health, USA) (Altschul *et al.*, 1990; Gish et States, 1993). La recherche est réalisée avec les séquences nucléotidiques (BLAST N) ou avec les séquences en acides aminés déduites dans les six cadres de lecture (BLAST X). Le score obtenu en BLAST X est considéré comme significatif lorsqu'il est supérieur à 70 d'identité, surtout lorsque la "p- value" correspondant à la probabilité d'erreur est faible (inférieure à 0,001) (Altschul *et al.*, 1990; Gish et States, 1993).

Les séquences sont également comparées par BLAST N avec les ORF de *Bifidobacterium longum* 010A (NZ_AABF000000000) et de *Bifidobacterium longum* NCC2705 (NC_004307).

Toutes les séquences nucléotidiques et protéiques utilisés dans cette étude sont récoltées sur le site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, par interrogation des banques de séquences nucléiques (GenBank, EMBL) et protéiques (SwissProt, PIR, bbs, PDB, gnl).

Résultats et Discussions

Chapitre I. Utilisation du fructose par *B. longum*

I. 1. Etude de la capacité de différentes souches de *B. longum* à croître en présence de fructose comme seule source de carbone

I. 1. 1. Introduction

La stratégie adoptée lors de l'étude du métabolisme du fructose chez *B. longum* a été d'utiliser comme témoin négatif une souche Fru⁻ qui possède également un phénotype FOS⁻. Utilisant la technique de calorimétrie, le Dr. Krzewinski a observé que la souche type *B. longum* DSM20219 disponible au laboratoire est FOS⁻ et Fru⁻ (Dr. F. Krzewinski, résultat non publié). Ce phénotype pourrait s'expliquer par des déficiences dans l'expression fonctionnelle des gènes impliqués dans le transport, le métabolisme ou la régulation de l'utilisation du fructose. Cette souche a été choisie pour caractérisation phénotypique et génotypique.

Le Dr. F. Gavini avec qui nous collaborons a isolé et caractérisé du point de vue génétique et phénotypique plusieurs souches de *B. longum*. Ainsi, il nous a été communiqué qu'environ 20% des 200 souches de *B. longum* d'origine intestinale humaine identifiées étaient incapables d'utiliser le fructose comme seule source de carbone (Fru⁻) (F. Gavini, communication personnelle). Dans le but d'analyser le métabolisme du fructose chez *B. longum*, nous avons du choisir une souche Fru⁺. Pour ce faire, 14 autres souches de *B. longum* d'origine intestinale humaine ont été analysées du point de vue de leur capacité à utiliser le fructose comme seule source de carbone.

I. 1. 2. Etude phénotypique de 15 souches de *B. longum*

Le milieu de Garches est un milieu semi synthétique qui ne permet pas la croissance des bifidobactéries sans ajout d'une source de carbone (cf. Matériels et Méthodes). Par conséquent, la capacité de 14 souches de *B. longum* d'origine intestinale humaine à fermenter le fructose a été analysée en milieu de Garches renfermant du fructose (10g/L) comme seule source de carbone (Tableau RD1, page 102). L'expérience a été conduite en observant, après 24 et 48 heures d'incubation, la présence ou non d'un trouble du milieu de culture correspondant à une croissance bactérienne. Des cultures bactériennes effectuées en milieu de Garches contenant du glucose (10g/L) ont servi de témoin positif de viabilité et de croissance des cellules utilisées comme inoculum.

Après 24 heures de culture, six de ces souches (A10C, BS 36 68 A2, BS 104 74 A3, BS 101 79 A3, B 773 MC et B 783 PC) présentent un phénotype Fru⁺ (Tableau RD1, page 102). Après 48 heures de culture, six autres souches de *B. longum* (BS 52 60 B4, BS 57 63 B4, BS 37 58 B5, BS 175 80 A5, A 133 et B3 GC) se sont révélées capables d'utiliser le fructose comme seule source de carbone (souches Fru⁺) (Tableau RD1, page 102).

Seulement trois souches de *B. longum* (la souche type DSM20219, la souche BS 8 57 A2 et la souche B 7 PC) se sont montrées incapables de croître, en 48 heures de culture, en présence de fructose comme seule source de carbone (phénotype Fru⁻) (Tableau RD1, page 102).

Tableau RD1. Croissance de 15 souches de *Bifidobacterium longum* d'origine intestinale humaine en présence de fructose et de glucose comme seule source de carbone.

Souche <i>B. longum</i>	Croissance en milieu Garches + Fru (24 h)	Croissance en milieu Garches + Glc (24 h)	Croissance en milieu Garches + Fru (48 h)	Croissance en milieu Garches + Glc (48 h)
BS 52 60 B4	-	+	+	+
BS 57 63 B4	-	+	+	+
BS 37 58 B5	-	+	+	+
BS 8 57 A2	-	+	-	+
BS 36 68 A2	+	+	+	+
BS 104 74 A3	+	+	+	+
BS 101 79 A3	+	+	+	+
BS 175 80 A5	-	+	+	+
A 133	-	+	+	+
B 7 PC	-	+	-	+
B 773 MC	+	+	+	+
B 783 PC	+	+	+	+
B3 GC	-	+	+	+
A10C	+	+	+	+
DSM20219	-	+	-	+

Les souches ont été cultivées pendant 24 h et 48 h dans un milieu Garches contenant du fructose (noté Fru), 10 g/L. Les cultures effectuées en milieu Garches contenant du glucose (noté Glc), 10g/L ont servi de témoin positif de croissance. L'expérience a été conduite en observant la présence (+) ou non (-) d'un trouble du milieu de culture, correspondant à une croissance bactérienne.

I. 1. 3. Discussion

Toutes les souches de *B. longum* testées sont capables d'utiliser le glucose comme seule source de carbone (Tableau RD1, page 102). En effet, pour chacune des 15 cultures effectuées, les cellules cultivées étaient viables et la quantité de substrat saccharidique fourni (10 g/L) n'a pas constitué pas un facteur limitant pour la croissance bactérienne.

Ce travail a montré que sur 15 souches de *B. longum* analysées, douze (soit 80%) se sont révélées Fru⁺ après 48 heures de culture en milieu Garches- fructose (Tableau RD1, page 102). Selon leur vitesse de croissance en présence de fructose, ces 12 souches ségrègent en deux sous classes. Une première série de 6 souches (série A, soit 40% des 15 souches analysées) réunit les sous espèces de *B. longum* capables de croître en présence de fructose pendant 24 heures de culture (A10C, BS 36 68 A2, BS 104 74 A3, BS 101 79 A3, B 773 MC et B 783 PC). Dans le cas des 6 autres souches Fru⁺ (série B, 52 60 B4, BS 57 63 B4, BS 37 58 B5, BS 175 80 A5, A133 et B3 GC), il a été observé un retard de croissance pendant les premières 24 heures de culture. Toutefois, 24 heures plus tard, ces 6 souches présentent un taux de croissance comparable avec celui observé pour les membres de la première série de souches Fru⁺.

Le retard de croissance observé pour les membres de la série B des souches de *B. longum* pourrait être lié à la présence du fructose comme seule source de carbone. Cela est à corréler avec l'expression des gènes codant pour les enzymes impliquées dans le transport et la fermentation du fructose. Il se peut ainsi que ces gènes soient inductibles par le fructose. Une deuxième explication porterait sur l'activation, dans les conditions de stress nutritif utilisées, des gènes cryptiques. Ce processus d'activation, en conditions de stress métabolique, des séquences génomiques phénotypiquement silencieuses implique divers mécanismes génétiques (mutation, recombinaison, insertion des éléments de type IS) et a déjà été décrit chez les bactéries (Hall *et al.*, 1983 ; Taddei *et al.*, 1995, Radman *et al.*, 2000). Par exemple, en 1995, Tadei et collaborateurs ont décrit chez *E. coli* le régulon SOS responsable de l'activation des gènes impliqués dans la survie bactérienne en conditions de stress métabolique ou génotoxique. Ces gènes, normalement silencieux, codent pour des protéines responsables de l'activation d'autres gènes associés aux phénomènes de mutations (*umuC*, *umuD*, *dinB*) et de recombinaison (*recA*, *recN*, *recQ*, *ruvA*, *ruvB*) dans le chromosome (Taddei *et al.*, 1995). Même si quelques uns de ces gènes (*recA*, *recN*, *recQ*, *ruvA*, *ruvB*) se sont révélés lors de l'analyse bioinformatique de la séquence chromosomique de *B. longum* NCC2705 (BL1453, BL1043, BL1153, BL0728, BL0729, respectivement), leur implication dans les processus décrits ci-dessus reste toutefois à démontrer.

Trois des 15 souches de *B. longum* analysées (20%) (la souche type DSM20219, la souche BS 8 57 A2 et la souche B 7 PC) sont incapables de proliférer en présence de fructose comme seule source de carbone, quelle que soit la durée de la culture bactérienne (24 heures ou 48 heures). Ces souches présentent un phénotype Fru⁻. Ce résultat confirme l'étude statistique effectuée par le Dr. F. Gavini. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ce phénotype Fru⁻ :

i) un génotype *fru*⁻. Selon cette hypothèse, ces trois souches ne posséderaient pas un ou plusieurs des gène(s) responsable(s) du transport et/ou du catabolisme du fructose.

ii) un génotype *fru*⁺, mais un phénotype Fru⁻. Cette hypothèse serait liée à l'existence des gènes silencieux (ou fortement réprimés) dans le cas de ces trois souches de *B. longum*.

La souche A10C a été choisie comme souche Fru⁺ pour la caractérisation moléculaire et enzymatique de la porte d'entrée du fructose dans la voie de fermentation des monosaccharides chez de *B. longum*. Cette souche est capable d'utiliser, dès les premières 8 heures de culture, le fructose comme seule source de carbone. De plus, la souche A10C est capable de métaboliser les FOS (F. Krzewinski, résultat non publié). Cette souche de *B. longum* présente 85% d'identité en séquence ADN avec la souche type DSM20219 (Dr. F. Gavini, hybridation ADN-ADN, communication personnelle).

Comme annoncé précédemment, la souche type *B. longum* DSM20219 a été sélectionnée comme souche Fru⁻.

I. 2. Etude comparative de l'utilisation du fructose et du glucose par *B. longum* A10C

I. 2. 1. Principe

Une étude comparative de l'utilisation du fructose et du glucose par *B. longum* A10C a été réalisée. Dans un premier temps, cela nous a permis d'estimer, par rapport à la quantité de substrat saccharidique utilisé, la quantité de biomasse formée. Puis, la capacité relative de cette souche à fermenter le fructose en comparaison avec le glucose. Par la suite, la voie de dégradation intracellulaire du fructose a été identifiée par chromatographie d'échange d'anions haute performance (HPAEC-PAD).

I. 2. 2. Etude de la consommation du fructose et du glucose par *B. longum* A10C

Pour étudier la consommation de deux hexoses (glucose et fructose) par *B. longum* A10C, les cellules bactériennes ont été cultivées pendant 8 heures (début de la phase exponentielle de croissance) et 16 heures (fin de la phase exponentielle) en milieu de Garches contenant du glucose (2 g/L), du fructose (2 g/L), ou un mélange équimoléculaire de glucose et fructose (2 g/L). La quantité de monosaccharide non fermenté a été mesurée après 8 et 16 heures de culture et le pourcentage de substrat saccharidique utilisé a été calculé (Tableau RT 2A, page 105). Pour chaque culture, la population bactérienne a été estimée par mesure de la quantité de protéines solubles (dosage selon la méthode de Bradford) (Tableau RD 2B, page 105). La souche *B. longum* DSM20219 cultivée en milieu de Garches contenant du glucose a servi de témoin positif de croissance.

i) Croissance de *B. longum* A10C en milieu de Garches renfermant une seule source de carbone

Lorsque la souche *B. longum* A10C a été cultivée en milieu de Garches contenant du glucose comme seule source de carbone, la quantité de monosaccharide détectée dans le milieu est de 0,722 g/L (soit 36,1%) après 8 heures de culture et nulle après 16 heures. La quantité de biomasse formée dans ces conditions de croissance correspond à 0,36 mg/mL

Tableau RD2. Utilisation du glucose (G) et du fructose (F) par *Bifidobacterium longum* A10C pendant 8 heures de culture.

A)

Substrats saccharidiques utilisés	Quantité moyenne de substrat saccharidique non fermenté (g/L)		Pourcentage de saccharide consommé	
	G	F	G	F
gG	0,72±0,09	-	63,9	-
fF	-	1,43±0,02	-	28,3
gGF	0,55±0,01	0,63±0,04	45	37,5
fGF	0,78±0,02	0,68±0,02	22	31,7
TgG	0,5±0,005	-	75	-
TfF	-	1,75±0,03	-	12,5

B)

Conditions de culture		Quantité de protéines solubles (µg/mL)
Temps de culture	Substrats saccharidiques utilisés	
8 heures de culture	gG	362,7±85,3
	fF	333,6±32,2
	gGF	321,6±107,2
	fGF	295,9±83,9
	TgG	989,7±55,3
	TfF	71,8±33,2
16 heures de culture	gG	1090,1±428,7
	fF	1272,6±477,3
	gGF	860,4±96,5
	fGF	1592,8±411,4
	TgG	654,9±45,3
	TfF	74,4±21,3

Les cellules bactériennes ont été cultivées en milieu de Garches contenant du glucose (2 g/L, noté G), du fructose (2g/L, noté F) ou un mélange équimoléculaire des deux hexoses (1g/L, noté GF). Les précultures ont été effectuées dans le même milieu renfermant du glucose (gG et gGF) ou du fructose (fF et fGF), à 2g/L. La souche *B. longum* DSM20219 a été utilisée comme témoin négatif (T).

(A) La quantité de substrat saccharidique non fermenté après 8 heures de culture a été détectée avec un kit de dosage Glucose/Fructose (Boehringer).

(B) La quantité de protéines solubles présentes dans l'extrait cellulaire de chaque type de culture a été mesurée après 8 et 16 heures de culture, par la technique de Bradford.

Chaque détermination a été réalisée en triple exemplaire et représente la moyenne de trois expériences différentes.

de protéines (après 8 heures de culture) et à 1,09 mg/mL de protéines (en fin de phase exponentielle) (Tableau RD 2A et 2B, page 105).

Lorsque le fructose est la seule source de carbone pour *B. longum* A10C, la quantité de ce monosaccharide détecté dans le milieu de culture après 8 heures est de 1,4 g/L (soit 71,7%) (Tableau RD 2A et 2B, page 105). Comme constaté précédemment pour le glucose, le fructose est entièrement consommé au bout de 16 heures de culture (Tableau RD 2A et 2B, page 105).

Une quantité de 0,33 mg/mL et de 1,27 mg/mL de protéines solubles est mesurée dans l'extrait cellulaire de *B. longum* A10C après 8 et 16 heures de culture, respectivement (Tableau RD 2A et 2B, page 105).

i) Croissance de *B. longum* A10C en milieu de Garches contenant un mélange équimoléculaire de glucose et fructose

Après 8 heures de croissance, la quantité de glucose non fermenté est de 0,55 g/l si la préculture a été effectuée en milieu de Garches+glucose et de 0,78 g/L si le monosaccharide utilisé dans la préculture est le fructose (Tableau RD2, page 105). Le taux de protéines solubles mesurées à partir de l'extrait enzymatique de types de culture est, dans les deux cas, d'environ 0,3mg/mL (Tableau RD2, page 105).

A la fin de la phase exponentielle, la totalité des saccharides disponibles dans le milieu a été utilisée (Tableau RD2, page 105). La quantité de protéines solubles dosées à partir de l'extrait cellulaire de la souche précultivée en glucose est de 0,86 mg/mL (Tableau RD2, page 105). La valeur maximale de biomasse correspondrait aux cultures effectuées en milieu contenant les deux monosaccharides, mais ensemencées à partir d'une préculture effectuée en Garches-fructose. Le taux de protéines solubles dosées dans ces conditions est de 1,6 mg/mL.

Dans tous les cas, le substrat saccharidique est entièrement consommé en 16 heures de culture.

iii) Conclusion

On peut conclure que, quelque soit la nature de l'hexose présent dans le milieu de culture (glucose, fructose ou un mélange équimoléculaire des deux monosaccharides), le taux de croissance de *B. longum* A10C (estimé par rapport à la quantité de protéines soluble) est le même (environ 0,3 mg/mL) au début de la phase exponentielle de croissance.

Ce résultat est confirmé pour les cultures de 16 heures réalisées en milieu de Garches renfermant une seule source de carbone (glucose ou fructose, 1 à 1,3 mg/mL de protéines solubles). Toutefois, lorsque les deux saccharides sont présents dans le milieu, la quantité de protéines mesurées à partir des cellules précultivées en Milieu de Garches-fructose (1,6 mg/mL) est plus importante par rapport à celle détectée dans les cellules précultivées en Milieu de Garches-glucose (0,8 mg/mL). Ces différences peuvent être liées à l'efficacité de lyse bactérienne par sonication. Cependant, les valeurs indiquées dans le Tableau RD1 représentent la moyenne de trois déterminations différentes, chaque expérience étant elle-même réalisée en triple.

Cette étude comparative de l'utilisation de ces deux hexoses par *B. longum* A10C suggère que des systèmes de régulation différents contrôlent le catabolisme de ces deux saccharides.

Ainsi, les mesures effectuées après 8 heures de culture, démontrent que la fermentation du glucose est plus rapide (2,7 g/mL/min) par rapport au fructose (1,1 g/mL/min). Cela indique, dans le cas du métabolisme du fructose, la participation des structures génétiques (gènes isolés ou opérons) inductibles, probablement par le fructose.

Lorsque les deux monosaccharides sont présents dans le milieu, l'analyse du taux de monosaccharides non fermentés après 8 heures de culture confirme l'hypothèse de l'induction des gènes responsables de l'utilisation du fructose. En effet, dans les conditions d'une préculture réalisée en fructose, le phénomène d'induction de ces gènes est absent. En effet, on observe que les quantités de fructose fermenté par les cellules provenant d'une préculture réalisée en fructose (0,37 g/L) et en glucose (0,31 g/L) sont similaires.

I. 2. 3. Voie de fermentation du glucose et du fructose par *B. longum*

Par la suite, nous nous sommes intéressés au devenir du fructose intracellulaire chez *B. longum*. Dans un premier temps, la voie métabolique permettant la fermentation du fructose chez *B. longum* A10C a été identifiée. Puis, la dégradation du fructose par les enzymes présentes dans l'extrait cellulaire de *B. longum* DSM20219 a été analysée, dans le but d'expliquer au niveau métabolique le phénotype Fru⁻ de cette souche.

I. 2. 3. 1. Identification de la voie de fermentation du fructose chez *B. longum* A10C

En 1967, de Vries a identifié la voie de la F6PPK comme étant la seule voie de fermentation du glucose chez *B. bifidum*. En effet, l'absence d'activité glucose-6-phosphate déshydrogénase rend impossible la dégradation du glucose-6-phosphate (la forme mobile, intracellulaire du glucose) via la D-glucono- δ -lactone 6-phosphate. Par conséquent, ni la voie des hexoses phosphates, ni la voie d'Entner-Doudouroff ne seraient fonctionnelles chez les bifidobactéries. De même, l'absence d'activité aldolase ne permet pas chez les bifidobactéries la conversion du fructose-1,6-diphosphate en glyceraldéhyde-3 phosphate (GA3P) et dihydroxyacétone phosphate (DHAP), par la voie de la glycolyse. Il apparaît ainsi que tous les hexoses capables d'être convertis en fructose-6-phosphate (le substrat de la F6PPK) sont susceptibles d'être fermentés par la voie de la F6PPK.

Nous avons, dans un premier temps, analysé par HPAEC-PAD les produits obtenus lors de la phosphorylation du glucose par l'extrait cellulaire de *B. longum* A10C (Figure RD 1A, page 108). Chaque pic a été identifié par rapport aux témoins en fonction du temps de rétention (t_R) sur la colonne chromatographique. Les saccharides ainsi détectés ont été comparés avec les intermédiaires de la voie de la F6PPK. Le chromatogramme obtenu est caractérisé par quatre pics associés aux saccharides (neutres ou phosphorylés) (Figure RD 1A, page 108). Ces saccharides correspondent au glucose ($t_R= 3,21$), au glucose-6-phosphate ($t_R= 30,81$), au fructose-6-phosphate ($t_R= 32,24$) et au sédoheptulose-7-phosphate ($t_R= 32,76$), respectivement.

Par la suite, l'extrait cellulaire de *B. longum* A10C a été incubé en présence de fructose et les produits de phosphorylation ont été séparés et analysés par la même technique. Le profil de fermentation du fructose présente également quatre pics identifiés comme correspondant au fructose en excès ($t_R= 3,24$), au glucose-6-phosphate ($t_R= 30,81$),

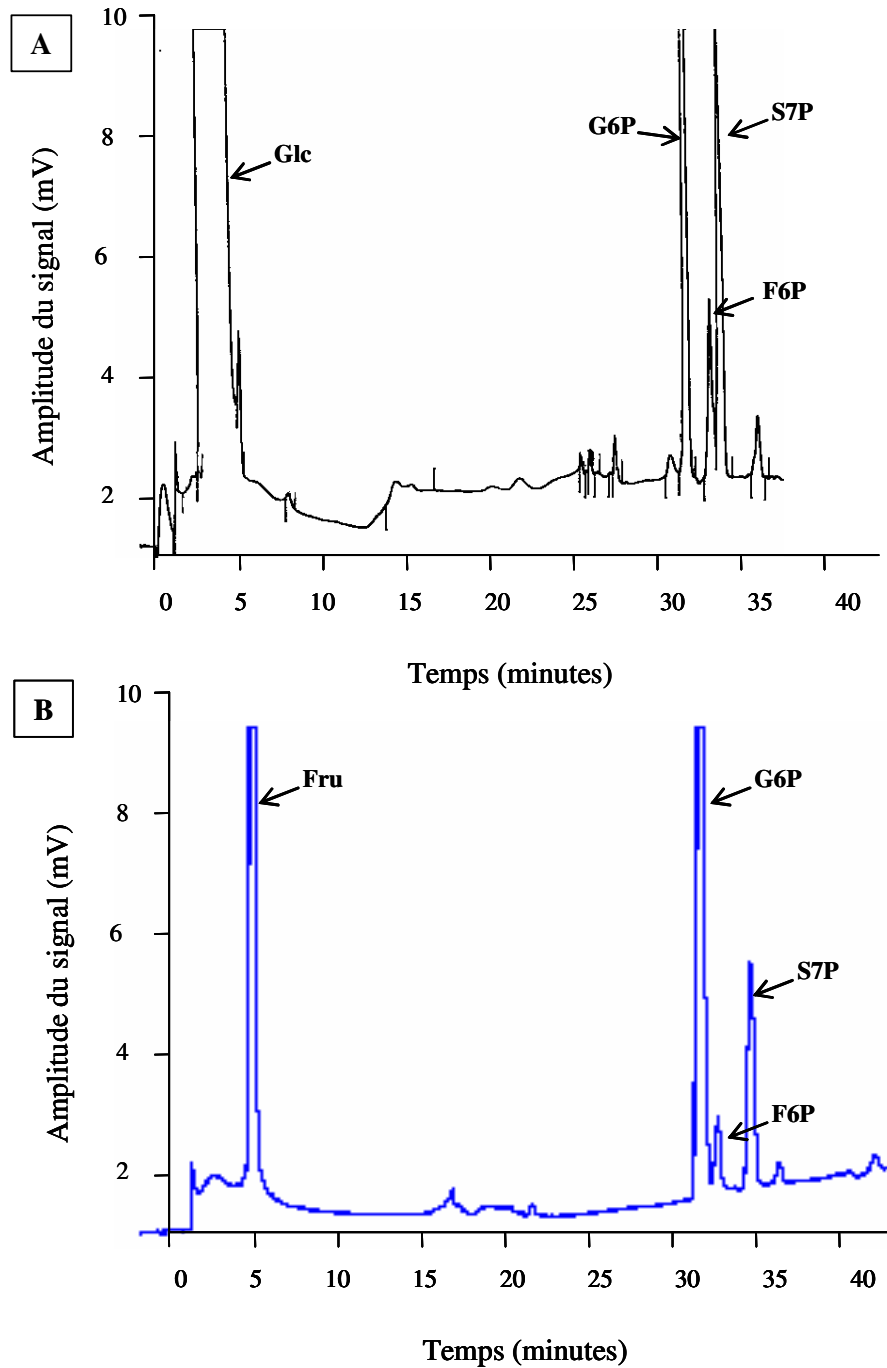


Figure RD1. Analyse par HPAEC-PAD du profil de fermentation du glucose (A) et du fructose (B) par l'extrait enzymatique de *B. longum* A10C. Les pics correspondant au glucose (Glc), fructose (Fru), glucose-6-phosphate (G6P), fructose-6-phosphate (F6P) et sédoheptulose-7-phosphate (S7P) sont indiqués par une flèche.

au fructose-6-phosphate ($t_R= 32,24$) et au sédoheptulose-7-phosphate ($t_R= 32,76$), respectivement (Figure. RD 1B, page 108).

On peut conclure de cette expérience que les profils de dégradation de ces deux hexoses sont similaires. Ces résultats, corroborés avec l'absence de détection de fructose-1,6-diphosphate, nous ont amené à considérer que, chez *B. longum* A10C, le glucose et le fructose sont fermentés par la même voie métabolique, la voie de la F6PPK.

I. 2. 3. 2. Analyse du profil de fermentation du fructose et du glucose par *B. longum* DSM20219

Le profil chromatographique obtenu lors de l'incubation du glucose avec l'extrait cellulaire de *B. longum* DSM20219 présente les mêmes quatre pics visualisés lors de l'analyse HPAEC-PAD du profil de fermentation du fructose par la souche A10C (Figure RD 2A, page 110). On peut en conclure que *B. longum* DSM20219 possède toutes les enzymes permettant la fermentation du glucose par la voie de la F6PPK.

Par contre, lorsque le fructose est incubé avec l'extrait cellulaire de la souche DSM20219, la technique de chromatographie utilisée permet la détection d'un seul pic correspondant au fructose non fermenté (Figure RD 2B, page 110). Aucun pic associé aux saccharides phosphorylés n'a été détecté (Figure RD 2B, page 110).

On peut donc conclure que la ou les enzymes nécessaire(s) à la conversion du fructose en un des intermédiaires du "shunt bifide" seraient absentes ou non fonctionnelles chez *B. longum* DSM20219.

I. 2. 3. 3. Enzymes potentiellement responsables de la phosphorylation du fructose chez *B. longum*

Chez les bactéries, la phosphorylation du fructose intracellulaire peut se réaliser de deux manières différant par la nature du donneur de résidus phosphate, le phosphoénol pyruvate (PEP) ou l'ATP.

I. 2. 3. 3. 1. Phosphorylation du fructose *via* un système de type PEP :PTS

Le premier type de processus de phosphorylation implique la participation du système de la phosphotransférase (PEP:PTS), qui permet la phosphorylation du fructose en fructose-1 phosphate concomitant avec le transport transmembranaire du monosaccharide (Titgemeyer *et al.*, 1995). Le transfert séquentiel du phosphate du PEP au fructose intracellulaire implique deux catégories de protéines: les enzymes générales du système de la phosphotransférase (EI et HPr) et une enzyme EII^{Fru} spécifique du fructose (Feldheim *et al.*, 1990 ; Nothaft *et al.*, 2003). Les gènes codant pour ces deux groupes d'enzymes (générales et spécifiques) diffèrent du point de vue de leur organisation génétique d'un organisme à l'autre (de Crécy-Lagard *et al.*, 1995 ; Geerse *et al.*, 1989 ; Macfadyen *et al.*, 1996 ; Parche *et al.*, 1999). Par exemple, chez *Streptomyces coelicolor*, les gènes *ptsH* (codant pour la protéine HPr), *ptsI* (codant pour la protéine EI) et *fruA* (codant pour l'enzyme EII^{Fru}) occupent des loci distincts sur le chromosome (Parche *et al.*, 1999 ; Parche *et al.*, 2000). Par contre, Geerse et collaborateurs (1989) ont observé que détecté chez *Salmonella typhimurium* un gène *fpr* codant pour une protéine (FPr) spécifique du

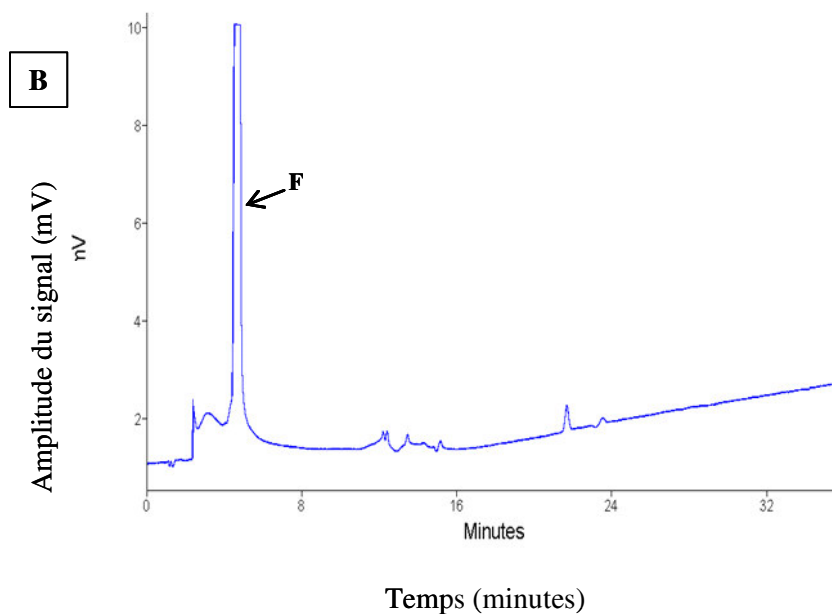
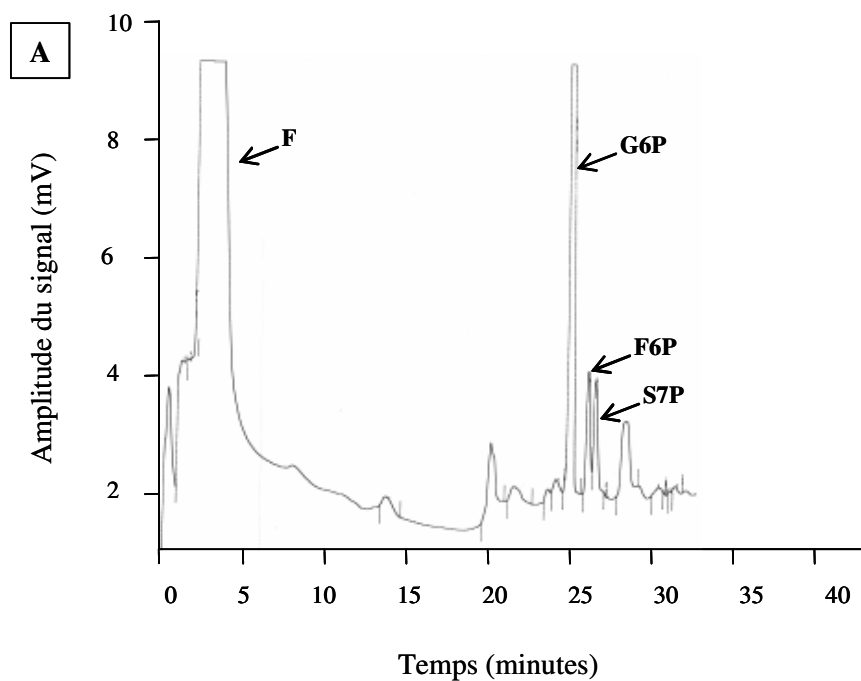


Figure RD2. Analyse par HPAEC-PAD du profil de fermentation du glucose (A) et du fructose (B) par l'extrait enzymatique de *B. longum* DSM20219. Les pics correspondant au glucose (G), fructose (F), glucose-6-phosphate (G6P), fructose-6-phosphate (F6P) et au sédoheptulose-7-phosphate (S7P) sont indiqués par une flèche.

fructose et qui possède trois domaines (HPr, EI et EI^{Fru}) fusionnés (Geerse *et al.*, 1989).

I. 2. 3. 3. 2. Phosphorylation du fructose *via* une fructokinase

Lorsque le donneur des résidus phosphoryle est l'ATP, la phosphorylation du fructose s'effectue au cours d'une seule réaction enzymatique catalysée par une fructokinase (2.7.1.4), conduisant au fructose-6-phosphate. La localisation génétique des gènes codants pour des fructokinases est variable. Chez la plupart des microorganismes, les gènes codant pour une fructokinase (*scrK*, *sacK* ou *cscK*) sont associés à un opéron (saccharose ou mannose) (Bockman *et al.*, 1992 ; Luesink *et al.*, 1999 ; Reid *et al.*, 1999 ; Thompson et Chassy, 1981 ; Thompson *et al.*, 1991). A l'heure actuelle, la littérature ne cite que quatre organismes, *Zymomonas mobilis*, *Fusobacterium mortiferum*, *Rhizobium leguminosarum* et *Mezorhizobium lotii* où un gène codant pour une fructokinase (*frK*) est isolé sur le chromosome (Zembrzuski *et al.*, 1992, Robrish *et al.*, 1991 ; Fennington et Hughes, 1996).

Par conséquent, chez les bifidobactéries, le fructose intracellulaire pourrait intégrer la voie de la F6PPK à deux niveaux :

a) comme substrat de l'hexokinase (EC 2.7.1.1), suite à une isomérisation du D-fructose en D-glucose (par une xylose isomérase, EC 5.3.1.5)

Plusieurs auteurs ont mis en évidence la présence, chez *Streptomyces* sp. et chez *Thermotoga* sp., d'une xylose isomérase (EC 5.3.1.5), capable de réaliser également l'interconversion du glucose en fructose (Bandlish *et al.*, 2002, Camacho-Rubio *et al.*, 1995 ; Collyer *et al.*, 1990 ; Kaneko *et al.*, 2001). L'équilibre de cette réaction d'isomérisation est normalement déplacé vers la formation du cétose (Bandlish *et al.*, 2002). Toutefois, la possibilité que cette enzyme catalyse la réaction inverse, de transformation du fructose en glucose a également été prise en compte. L'analyse bioinformatique de la séquence chromosomique de *B. longum* NCC2705 a révélé la présence d'une xylose isomérase putative (gène *xylA*, BL1704) chez cette espèce. Cette protéine putative présente 29% d'identité avec la séquence de la protéine homologue caractérisée chez *S. olivaceoviridis* et 60% à 100% d'identité au niveau des motifs consensus spécifiques des xyloses isomérases. En effet, les signatures peptidiques

[FL]-H-D-x-D-[LIV]-x-[PD]-x-[GDE] et
[LI]-E-P-K-P-x(2)-P

proposées par Henrick *et al* (1989) et par Vangrysterre *et al.* (1989) pour les xylose isomérases bactériennes se retrouvent sur la séquence de la protéine BL1704 sous la forme ¹⁰⁰FHDDDLIPFGSSDTE₁₁₄ et ²³⁰IEPKNPEP₂₃₈, respectivement. Toutefois, si le produit du gène *xylA* pouvait réaliser l'isomérisation du fructose en glucose chez *B. longum*, la souche DSM20219 qui exprime de manière fonctionnelle toutes les enzymes de la voie de la F6PPK, devrait pouvoir métaboliser le fructose via le glucose-6-phosphate. Or, aucun produit phosphorylé n'a pu être détecté lors de l'incubation du fructose avec l'extrait cellulaire de *B. longum* DSM20219 (Figure RD 2B, page 110).

Nous avons donc conclu que chez *B. longum*, le fructose intégrerait le "shunt bifide" sous la forme d'un produit phosphorylé.

b) comme substrat de la F6PPK, suite soit à une isomérisation du fructose-1-P en fructose-6-P (b₁), soit à une phosphorylation directe du fructose en fructose-6-P (par une fructokinase, EC 2.7.1.4) (b₂).

b₁) Dans leur analyse bioinformatique de la séquence chromosomique de *B. longum* NCC2705, Schell *et al.* (2002) ont détecté la présence d'un seul probable système de type PEP:PTS (Schell *et al.*, 2002). Ainsi, les gènes *ptsI* (BL0411) et *ptsH* (BL0412) coderaient pour les enzymes responsables du transfert séquentiel d'un résidu phosphate du PEP à la protéine HPr *via* EI. Par contre, cette étude ne révèle la présence d'aucune protéine homologue aux protéines de type EII^{Fru}. *B. longum* ne semble donc pas posséder un système de phosphotransférases spécifique du fructose. Cette information obtenue par voie bioinformatique est confirmée par l'analyse du profil de phosphorylation du fructose par le lysat cellulaire de *B. longum* A10C. En effet, aucun pic associé au fructose-1-phosphate, le produit de l'enzyme EII^{Fru}, n'a pu être détecté par HPAEC-PAD (Figure RD 1B, page 108).

b₂) Notre hypothèse est que le fructose, formé lors de l'hydrolyse/phosphorolyse intracellulaire des substrats contenant ce monosaccharide intègrerait le shunt bifide *via* le fructose-6-phosphate. L'enzyme responsable de cette transformation est une fructokinase (EC 2.7.1.4). De plus, l'analyse du profil de phosphorylation du fructose par l'extrait cellulaire de la souche DSM20219 suggère l'absence d'activité fructokinase chez cette souche.

Afin de vérifier ces hypothèses, une approche moléculaire du métabolisme du fructose chez *B. longum* a été initiée.

Chapitre II. Clonage du gène *frK* codant pour une fructokinase de *B. longum* A10C

II. 1. Localisation génomique et analyse du contexte génétique du gène *frK*

II. 1. 1. Généralités

En 2001, lorsque nous avons initié ce travail, la séquence génomique de *B. longum* n'était pas encore connue. Par conséquent, deux approches différentes ont été entreprises en parallèle, dans le but de localiser, au niveau chromosomique, le gène codant pour la fructokinase de *B. longum* A10C.

Une étude bibliographique montre que, chez la plupart des bactéries à Gram positif, le gène codant pour une fructokinase (*scrK* ou *sacK*) fait partie d'un opéron saccharose (Bockman *et al.*, 1992 ; Luesink *et al.*, 1999 ; Reid *et al.*, 1999 ; Thompson et Chassy, 1981 ; Thompson *et al.*, 1991). *B. longum* A10C étant saccharose positif, nous avons essayé, dans un premier temps, d'isoler l'opéron responsable du métabolisme du saccharose chez cette souche. Cela a été réalisé par digestions ménagées de l'ADN_g de *B. longum* A10C, ligation des fragments correspondant à la taille attendue dans un vecteur de clonage (pBC ou pDG7). Des essais de complémentations en système hétérologue (chez *E. coli* NM522, saccharose négatif) et en système homologue (chez *B. longum* DSM20219) ont été ensuite réalisées utilisant les plasmides recombinant ainsi obtenus.

La possibilité que le gène codant pour la fructokinase ne soit pas inclus dans un opéron saccharose chez *B. longum* a été également prise en compte. Par conséquent, en parallèle de cette technique de complémentation, une stratégie de clonage par PCR du gène ciblé a été définie. La littérature indique que la plus grande majorité de fructokinases bactériennes appartiennent à la famille ROK des kinases spécifiques des saccharides. L'alignement des séquences en acides aminés de différentes fructokinases de type ROK nous a permis de définir des amorces oligonucléotidiques dégénérées, localisées au niveau des motifs peptidiques conservés. Ces couples d'amorces ont été utilisées pour amplifier des fragments d'ADN_g de *B. longum* 10C de tailles comprises entre 500 pb et 900 pb. Ces amplicons ont été clonés et séquencés.

La publication de la séquence chromosomique annotée de deux souches de *B. longum* (DJ010A et NCC2705) nous a permis, à partir de septembre 2002, de définir une troisième stratégie de travail. Des amorces oligonucléotidiques spécifiques de la séquence d'ADN de *B. longum* ont été employées pour amplifier, par PCR, le cadre de lecture d'une fructokinase putative.

Dans ce sous-chapitre, nous allons présenter chacune des techniques utilisées pour la localisation du gène codant pour la fructokinase de *B. longum* A10C.

II. 1. 2. Localisation chromosomique du gène codant pour la fructokinase de *B. longum* A10C

II. 1. 2. 1. Clonage par complémentation de l'opéron saccharose de *B. longum* A10C

II. 1. 2. 1. 1. Introduction

Chez la plupart des bactéries à Gram positif, l'opéron saccharose est généralement constitué de quatre gènes: un gène codant pour un régulateur (*scrR* ou *sacR*), un gène codant pour l'enzyme EII^{Sac} du système de la phosphotransférase (*scrB* ou *sacB*), un gène responsable de la synthèse d'une saccharose phosphorylase (*scrA* ou *sacA*) et un gène codant pour une fructokinase (*scrK* ou *sacK*) (Figure RD 3, page 115). Par exemple, il a récemment pu être démontré chez *Streptococcus mutans* que l'un des gènes de l'opéron *scr* permettant le métabolisme du saccharose codait pour une fructokinase (Sato *et al.*, 1993). Ce gène, appelé *scrK*, a pu être cloné et exprimé en hétérologue chez la bactérie à Gram négatif *E. coli*. Les souches d'*E. coli* K-12 ne métabolisent pas le saccharose (Aulkemeyer *et al.*, 1991). Cette incapacité a souvent été utilisée pour cloner chez ce microorganisme les opérons *scr* (5 à 10 kb) de diverses bactéries à Gram négatif (Aulkemeyer *et al.*, 1991). Par ailleurs, il a déjà été démontré que des gènes de bifidobactéries pouvaient s'exprimer chez *E. coli* K-12 (Nunoura *et al.*, 1996). Tous ces éléments nous ont conduit à choisir de cloner l'opéron saccharose de *Bifidobacterium longum* A10C chez la souche NM522 d'*E. coli* K-12 (complémentation en système hétérologue). Puisqu'on disposait d'une souche Fru⁻ (*B. longum* DSM20219), nous avons également essayé de cloner l'opéron saccharose de *B. longum* A10C chez *B. longum* DSM20219 par complémentation en système homologue.

II. 1. 2. 1. 2. Clonage par complémentation de l'opéron saccharose de *B. longum* A10C

i) Complémentation en système hétérologue chez *E. coli* NM522

L'ADN_g de *Bifidobacterium longum* A10C a été extrait et digéré par l'endonucléase *Sau3A*. Cette enzyme reconnaît un site spécifique de coupure de 4 nucléotides et coupe potentiellement l'ADN chromosomique toutes les 400 paires de bases. Une digestion ménagée par cette enzyme a permis d'obtenir des fragments d'ADN migrant sur gel d'agarose à 0,7% entre 1 et 12 Kb. Par conséquent, des fragments compris entre 5 et 10 Kb ont été extraits du gel et ligés au site *Bam*HI du plasmide pBluescript (pBC, Cm^R). Le mélange de ligation obtenu a été introduit par transformation au tampon TSS dans la souche NM522 (phénotype saccharose négatif) d'*E. coli* K-12. Les transformants ont ensuite été étalés sur milieu minimum M63 contenant du chloramphénicol (50 µg/mL) et du saccharose (2 g/L) comme seule source de carbone. Sur ce milieu, seuls les transformants contenant l'opéron *scr* de *B. longum* cloné sur le vecteur pBC pourraient former une colonie. L'efficacité de transformation a été contrôlée par étalement d'une partie des transformants sur milieu minimum M63 contenant du glucose (2 g/L) comme seule source de carbone. Par cette approche, nous n'avons pas réussi à isoler l'opéron saccharose de *B. longum* A10C parmi les 2000 clones testés.

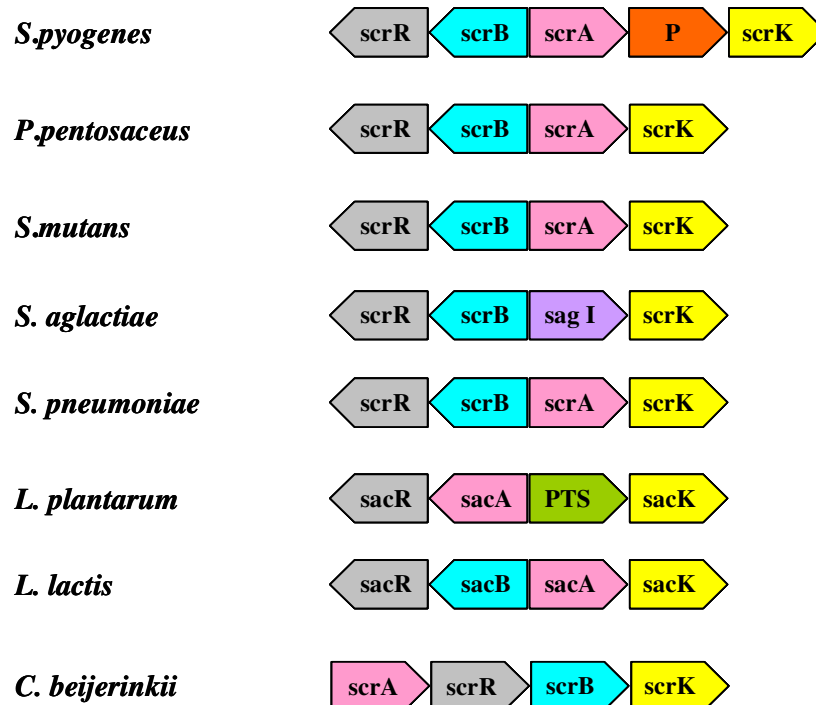


Figure RD 3. Organisation génétique de l'opéron saccharose chez différentes bactéries à Gram positif. En gris: le gène codant pour le régulateur transcriptionnel (*scrR* ou *sacR*), en bleu: le gène codant pour l'enzyme EII^{Sac} du système de la phosphotransférase spécifique du saccharose (*scrB* ou *sacB*), en rose: le gène codant pour la saccharose phosphorylase (*scrA* ou *sacA*), en jaune: le gène codant pour la fructokinase (*scrK* ou *sacK*), en violet: le gène codant pour une fructosidase putative (*sagI*), en vert: le gène codant pour un transporteur PTS, en rouge une protéine (*P*) de fonction inconnue.

Trois hypothèses pourraient expliquer cet insuccès : absence de l'opéron saccharose chez *B. longum* A10C, transcrits non fonctionnels chez *E.coli*, insuffisamment de clones analysés.

Récemment, Trindade *et al.* (2003) ont isolé (par complémentation d'une souche d'*E. coli*) et caractérisé un fragment d'ADN de 4.6 kb codant pour trois protéines impliquées dans le métabolisme du saccharose chez *Bifidobacterium lactis* (Trindade *et al.*, 2003). Cela confirme la présence d'une organisation de type opéron des gènes impliqués dans le métabolisme du saccharose chez *Bifidobacterium* sp.

Cet opéron est constitué de trois gènes codant pour une saccharose phosphorylase (ScrP), un régulateur transcriptionnel de type GalR-LacI (ScrR) et un transporteur spécifique de saccharose (ScrR) (Trindade *et al.*, 2003). Par contre, aucun gène potentiellement impliqué dans la phosphorylation du fructose n'a été détecté par cette étude.

ii) Complémentation en système homologue chez *B. longum* DSM20219 (Fru⁻)

L'absence de certitude quant à la colocalisation sur un même opéron des gènes codant pour le métabolisme du saccharose chez les bifidobactéries et du gène codant la fructokinase nous a amené à entreprendre en parallèle de cette première approche une autre stratégie. Cette stratégie a consisté à cloner directement en homologue le gène codant la fructokinase de *B. longum* A10C (Fru⁺) chez *B. longum* DSM20219 (Fru⁻).

Ainsi, les fragments d'ADN génomique de *Bifidobacterium longum* A10C de tailles de 1 à 5 kb obtenus après digestion par *Sau3A* sont introduits au site *Bam*HI du plasmide navette *E. coli*/*B.longum* pDG7 (Rossi *et al.*, 1998). Le mélange de ligation est, dans un premier temps, introduit par transformation chez *E. coli* K-12 (NM522). Les transformants sont étalés sur milieu non sélectif (LB, Cm) comme décrit précédemment. Les plasmides transformés sont ensuite extraits des cellules d'*E. coli* et utilisés pour transformer, par électroporation, des cellules de *B. longum* DSM20219. Les transformants sont sélectionnés sur milieu semi-synthétique de Garches contenant du fructose comme seule source de carbone. Seuls les transformants contenant le gène codant pour une fructokinase fonctionnelle cloné sur le plasmide pDG7 pourraient se développer sur ce milieu. En exploitant cette approche, nous avons obtenu des transformants viables chez *E. coli*. Cependant, nous avons éprouvé des difficultés lors de l'électroporation des cellules de *B. longum*. Ce travail a été entrepris jusqu'à la publication sur réseau informatique de la séquence génomique de deux souches de *B. longum* (DJ010A et NCC2705).

II. 1. 2. 2 Clonage par homologie de séquence avec d'autres fructokinase caractérisées

Cette stratégie est basée sur la présence des motifs peptidiques conservés dans la séquence en acides aminés de fructokinases identifiées chez différentes bactéries Gram positive (Figure RD 4, page 117). Des oligonucléotides dégénérés correspondant à ces régions conservées ont pu être définis (Figure RD 4, page 117) et utilisés en PCR pour amplifier le gène codant la fructokinase de *B longum*. Toutefois, aucun des produits de PCR obtenus par cette approche n'a été exploitable.

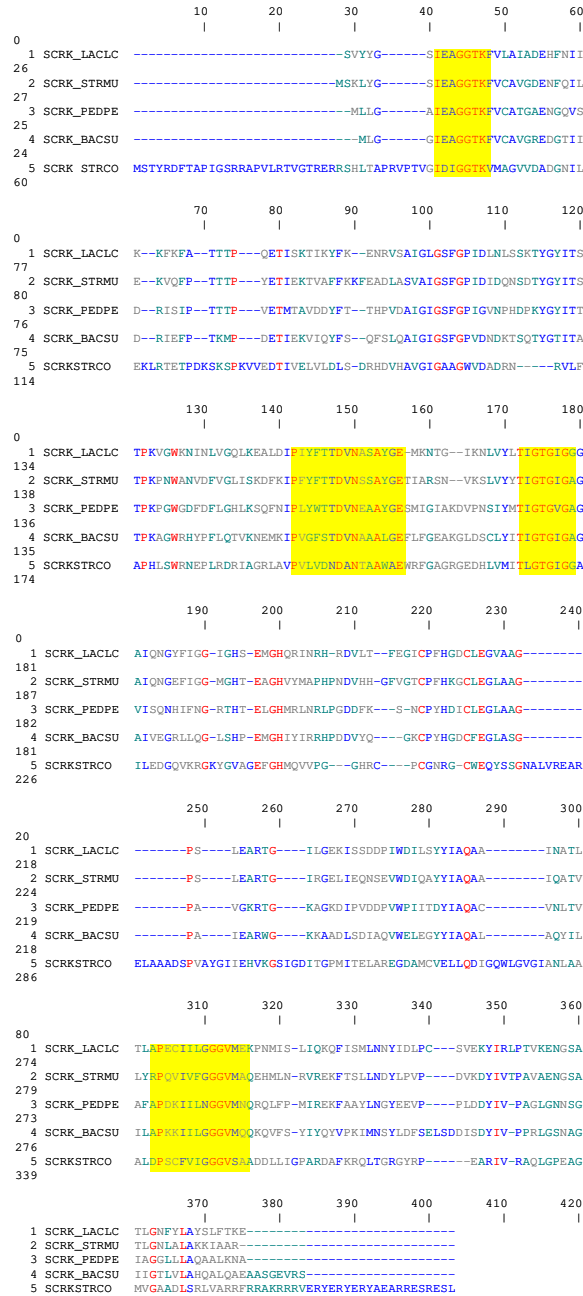


Figure RD 4. Alignement des séquences en acides aminés des fructokinases (ScrK) de cinq bactéries à Gram positif: *Lactococcus lactis* (noté LACL), *Streptococcus mutans* (noté STRMU), *Pediococcus penthosaceus* (noté PEDPE), *Bacillus subtilis* (noté BACSU) et *Streptomyces coelicolor* (noté STRCO). Les séquences peptidiques consensus utilisés pour la définition des amorces oligonucléotidiques sont marquées par un rectangle jaune. Les couleurs utilisés indiquent l'identité de séquence (rouge, 100%), bleu (=75%), vert (=50%) et noir (<50%).

II. 1. 2. 3. Analyse de la séquence chromosomique annotée de deux souches de *B. longum* (DJ010A et NCC2705)

II. 1. 2. 3. 1. Introduction

Le gène codant pour une fructokinase a été identifié par analyse bioinformatique de la séquence chromosomique des deux souches de *B. longum* (DJ010A et NCC2715).

II. 1. 2. 3. 2. Identification d'un gène codant pour une fructokinase putative à partir de séquences génomiques publiées de *B. longum*

i) localisation chromosomique et analyse du contexte génétique

L'analyse bioinformatique de la séquence chromosomique de deux souches de *Bifidobacterium longum* (DJ010A et NCC2705) nous a permis d'identifier une seule séquence nucléotidique de 894 pb, localisée à la minute 74' sur le chromosome bactérien et codant pour une fructokinase (putative) (gène 1774 pour *B. longum* DJ010A et BL1339 pour *B. longum* NCC2705, respectivement) (NP_696503.1, [NC_004307](#)). Cette séquence, annoncée par ses auteurs comme codant pour une enzyme de la famille PFKB des kinases spécifiques des saccharides a été soumise aux banques de données nucléotidiques (blast N) et protéiques (blast X). Le maximum d'homologie (31% d'identité en séquence en acides aminés) a été obtenu par rapport à une fructokinase putative de *Methanosarcina acetivorans*. De très faibles identités de séquence (inférieures à 25%) avec des fructokinases caractérisées chez d'autres organismes ont été obtenues.

Chez *B. longum* NCC2705 l'analyse du contexte génétique du locus de BL1339 a révélé la présence en amont de ce gène d'un ORF (BL 1340) codant pour un régulateur transcriptionnel de la famille ROK (Répresseur, ORF, Kinases) et en aval d'un gène (BL 1338) codant pour une protéine non identifiée (Figure RD5, page 119). Un ORF (BL 1341) codant pour une probable glucokinase de la famille ROK est localisé 1,5 kb en amont du locus de BL1339 et orienté en phase inverse par rapport à celui-ci. Chez *B. longum* DJ010A, le contexte génétique du gène 1744 ne diffère par rapport au gène BL 1339 que par une séquence nucléotidique non codante localisée 1100 pb en amont du gène 1744 (Figure RD5, page 119).

Ces analyses informatiques nous ont amenés à conclure que nous avons identifié le locus d'un même gène.

ii) analyses de séquences nucléotidiques et protéiques

Le cadre ouvert de lecture de la séquence codant pour cette fructokinase hypothétique permet la traduction d'une protéine de 298 acides aminés, dont la masse moléculaire calculée est de 33 kDa. La séquence en acides aminés déduite à partir de la séquence nucléotidique possède les deux signatures (ou séquences consensus) des fructokinases de la famille PfkB sous la forme (Figure RD 6, page 120):

²⁴GGAPVNFA YHAMKNGTEGW AISAVG₄₈ (motif PfkBI) et

²³⁸DTVGAGDSFSG₂₄₈ (motif PfkB II).

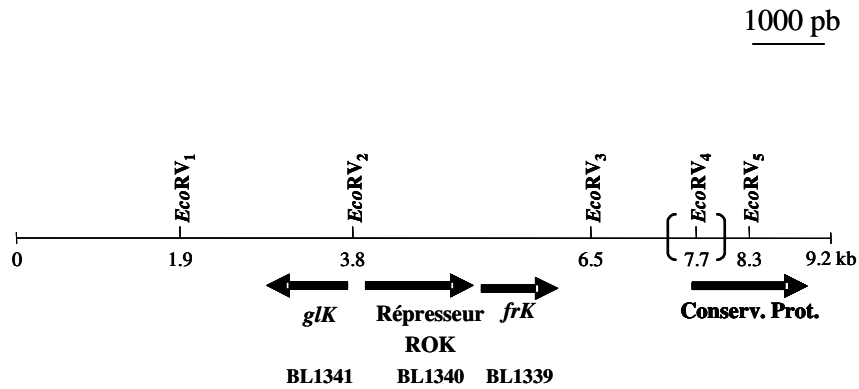


Figure RD 5. Organisation génétique du locus *frK* chez *B. longum*. La séquence nucléotidique de 9,2 kb de *B. longum* DJ010A diffère par rapport à la séquence homologue de *B. longum* NCC2705 par un fragment supplémentaire de 1,1 kb marqué par []. Les cadres de lecture codant pour une fructokinase putative (*frK*, gène BL1339), un répresseur de la famille ROK (gène BL1340) et une glucokinase putative (*gIK*, gène BL1341) sont indiqués.

i)

SCRK_ECOLI/28-52	GGAPANVAVGiARlGGtSGFIgrVG
SCRK_KLEPN/28-52	GGAPANVAVGvARlGGdSGFIgrVG
SCRK_SALTY/28-52	GGAPANVAVGvARlGGnSGFIgAVG
SCRK_SOLTU/43-67	GGAPANVAiavtrlGGkSaFvGklG
SCRK_VIBAL/27-51	GGAPANVAVaiARlSGkSaFfGrVG
FRK _BILON/24-48	GGAPvNfAyhamknGtegwaIsaVG

ii)

SCRK_ECOLI/245-258	DSTGAGDAFVAG
SCRK_KLEPN/245-258	DTTGAGDAFVAG
FRK _RHILT/243-256	DTvGAGDtFdAG
SCRK_SALTH/159-172	DTTGAGDAFVAG
SCRK_SALTY/245-258	DTTGAGDAFVAG
SCRK_SOLTU/252-265	DTTGAGDsFVGA
SCRK_VIBAL/243-256	DTTGAGDAFVGG
FrK _BILON/238-248	DTvGAGDsFsG-

Figure RD6. Motifs peptidiques spécifiques de la séquence en acides aminés des fructokinases de la famille PfkB.

i) Signatures peptidiques PfkBI des fructokinases (ScrK ou FrK) caractérisées chez *E. coli* (ECOLI), *Klebsiella pneumoniae* (KLEPN), *Salmonella typhimurium* (SALTY), *Solanum tuberosum* (SOLTU), *Vibrio alginolyticus* (VIBAL) et *Bifidobacterium longum* A10C (BILON).

ii) Signatures peptidiques PfkBII des fructokinases caractérisées chez *E. coli* (ECOLI), *Klebsiella pneumoniae* (KLEPN), *Rhizobium leguminosarum* (RHILT), *Salmonella thompson* (SALTH), *Salmonella typhimurium* (SALTY), *Solanum tuberosum* (SOLTU), *Vibrio alginolyticus* (VIBAL) et *Bifidobacterium longum* A10C (BILON).

Les identités de séquence en acides aminés sont marquées en rouge (100%), en bleu (>75%), en vert (>50%) et en noir (<50%).

L'alignement de séquence nucléotidique du gène identifié chez ces deux souches de *Bifidobacterium longum* (DJ010A et NCC2705) permet de constater que les 14 nucléotides qui diffèrent (soit 98% d'homologie), n'induisent que deux modifications au niveau de la séquence peptidique (soit 99,3% d'identité, Figure RD 7, page 122). En effet les résidus de glutamate E₁₆₁ et d'aspartate D₁₉₅ de la fructokinase putative de *B. longum* DJ010A sont remplacés par un aspartate D₁₆₁ et par une thréonine T₁₉₅ chez *B. longum* NCC2705. Le glutamate (E) et l'aspartate (D) ont le même indice d'hydrophobie (-3.5) et des poids moléculaire proches (128 Da pour le glutamate et 115 Da pour l'aspartate). La thréonine (T) a elle aussi un caractère hydrophile (indice d'hydrophobie -0.7) et un poids moléculaire (101,1Da) peu différent par rapport à l'aspartate. Seul le remplacement d'un résidu d'aspartate par un résidu de thréonine pourrait se traduire, au niveau de la structure protéique secondaire, par le gain d'un potentiel pont hydrogène supplémentaire.

Ces observations nous permettent de considérer que les deux modifications constatées dans la séquence en acides aminés déduite à partir de la séquence chromosomique des deux souches analysées n'affecteraient pas la mise en conformation ni la fonction enzymatique de la protéine.

A l'exception du gène *frK* de *Rhizobium leguminosarum*, tous les autres gènes de fructokinases ainsi analysées font partie d'un opéron saccharose (gène *scrK*). Nous nous sommes donc intéressés, dans un deuxième temps, à l'organisation génétique du locus du gène codant pour la fructokinase de *B. longum*. L'analyse *in silico* d'un fragment d'ADN entourant de 1,5 kb le locus de ce gène nous a permis les observations suivantes :

- aucune séquence "classique" de type -35, -10 de fixation de l'ARN polymérase située en amont du codon ATG du gène codant pour la fructokinase n'a pu être identifiée par traitement bioinformatique ;

- une séquence de 8 nucléotides (GGAAAGG) identifiée 10 pb en amont du codon ATG pourrait constituer un RBS (ribosome binding site) putatif;

- un gène codant pour un régulateur putatif de type ROK, située en amont du gène d'intérêt et orientée dans le même sens suggérerait que les deux cadres de lectures seraient transcrits en opéron.

Toutes ces informations nous ont permis de conclure que, chez *B. longum*, le gène codant pour la fructokinase n'est pas co-transcrit avec les gènes impliqués dans le métabolisme du saccharose. Chez *Rhizobium leguminosarum* et *Zymomonas mobilis* un gène *frK* codant pour une fructokinase est également isolé sur le chromosome. Par conséquent, nous avons décidé d'appeler ce gène *frK*.

II. 2. Clonage, séquençage du gène *frK* de *B. longum* A10C et analyse de séquence

II. 2. 1. Définition des amorces nucléotidiques spécifiques de la séquence de 894 pb

L'analyse de ces deux séquences nucléotidiques révèle un codon potentiel d'initiation de la traduction ATG en position 1-3 et un codon d'arrêt de la traduction TAA situé en position 892-894 (les valeurs sont données par rapport à l'adénine 1 du codon ATG). Le cadre ouvert de lecture définit donc une séquence codante de 894 pb.

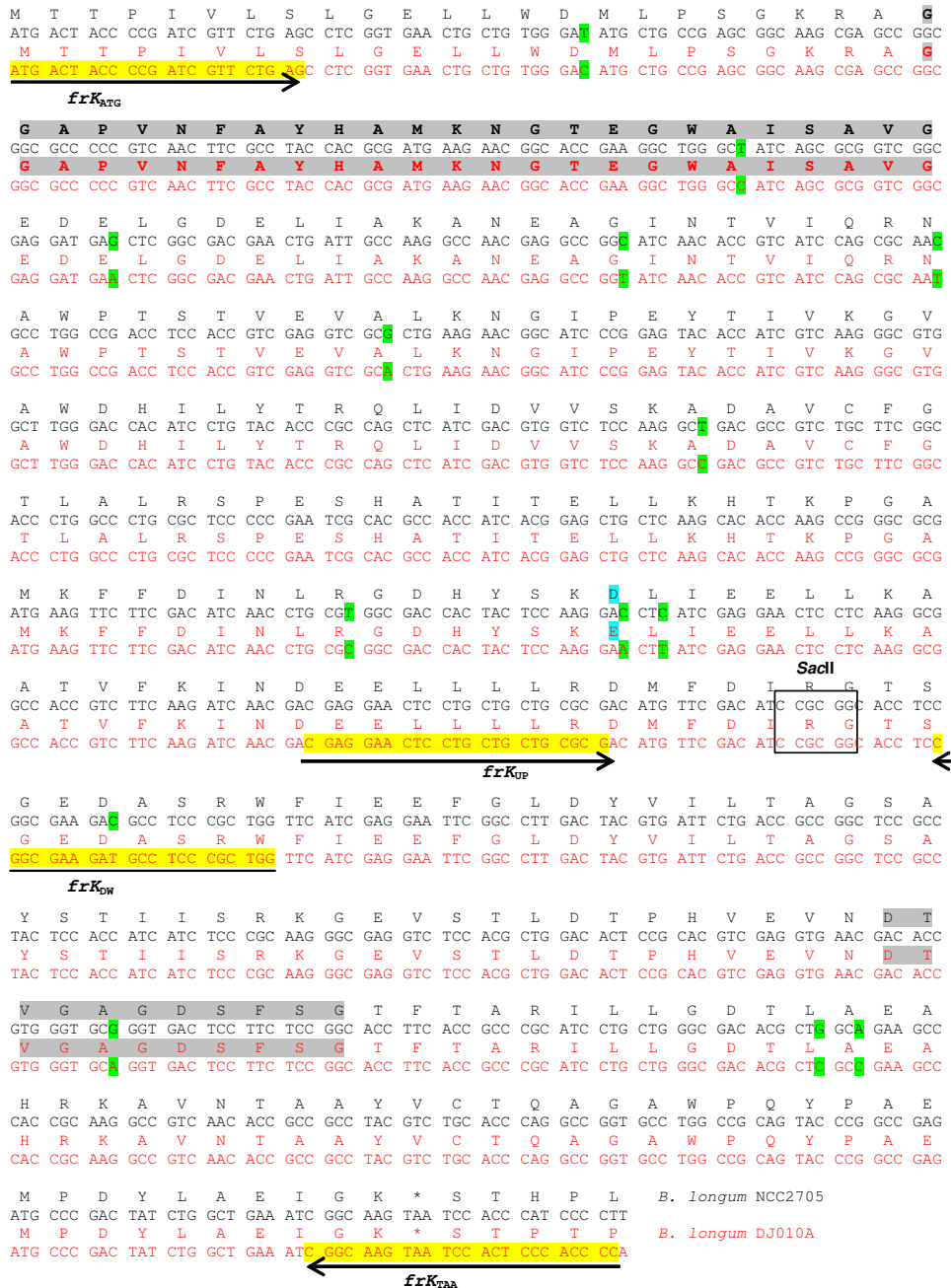


Figure RD 7. Alignement des séquences nucléotidiques et en acides aminés de la fructokinase identifiée par analyse bioinformatique de la séquence chromosomique des deux souches de *B. longum* (DJ010A et NCC2715). En bleu, les modifications des séquences en acides aminés des deux fructokinases. En vert, les modifications des séquences nucléotidiques des deux gènes analysés. La séquence des différentes amorces oligonucléotidiques utilisées lors de l'amplification par PCR du cadre de lecture du gène *frK* est en jaune. L'orientation 5'-3' de chaque amorce est marquée par une flèche. En gris, les motifs PfK BI et PfK BII, respectivement. Le site de restriction de l'enzyme *SacII* est marqué par un rectangle.

Tableau RD 3. Séquence nucléotidique des amorces utilisées dans cette étude.

Oligonucléotide	Séquence nucléotidique (5' 3')
<i>frK</i> _{ATG}	5'-CATGACTACCCCGATCGTTCTGAG-3'
<i>frK</i> _{TAA}	5'-GGGGTGGGAGTGGATTACTTGCCG-3'
<i>frK</i> _{UP}	5'-CGAGGAACCTCTGCTGCTGCGCG-3'
<i>frK</i> _{DW}	5'-CCAGCGGGAGGCATCTTCGCCC-3'
<i>frK</i> _{NdeI}	5'-GGAAAGGAAACCACATATGACTACCCCG-3' ^a
<i>frK</i> _{BamHI}	5'-GCTTGGGGTGGGATCCGATTACTTGCCG-3' ^b
<i>glK</i> _{ATG}	5'-ATGAACAACAGGGGAGGACTGATG-3'
<i>glK</i> _{TAA}	5'-GCCCCGGCACTATGCCAGGCTACG-3'
Amorce 1	5'-CGGGGTTGGTGATCAGCGAG-3'
Amorce 2	5'-CGGCCCCGCCTATGATCGTG-3'
Amorce 3	5'-CATCAGCATCGACCTGACGCAG-3'
Amorce 4	5'-CGATGGCCTCGCCCTGTACG-3'
Amorce 5	5'-CATGTCGGCATTCCGACCACGG-3'
Amorce 5N	5'-CGACTGATCGCAACCGGTGAG-3'
Amorce 6	5'-CGAGAGCAGGTAGCTGGCGG-3'
Amorce 6N	5'-CTGGGGCGGAAGCCGGACCAG-3'
Amorce 7	5'-CCGACGGTCTGGGACACGTCAATG-3'
Amorce 8	5'-CCCGGCGCATGGGTGCCGTCCG-3'

^{a, b} Les séquences en gras correspondent aux sites de restriction des endonucléases *NdeI* et *BamHI* respectivement.

La séquence nucléotidique ainsi identifiée nous a permis de définir trois couples d'oligonucléotides spécifiques de la séquence en ADN de *B. longum* DJ010A (Tableau RD3, page 123). La séquence des amorces *frK*_{ATG} (Figure. RD 7, page 122) et *frK*_{TAA} prend en compte respectivement les codons START (ATG) et STOP (TAA) ainsi identifiés. Deux oligonucléotides appelées *frK*_{UP} (pour le brin sens) et *frK*_{DW} (pour le brin anti-sens), localisées de part et d'autre du site de restriction de l'enzyme *Sac*II ont été ensuite définis pour faciliter le sous-clonage et le séquençage du gène (Figure RD 7, page 122).

II. 2. 2. Clonage du cadre de lecture du gène *frK*

II. 2. 2. 1. Amplification du cadre de lecture du gène *frK*

Le couple d'amorces *frK*_{ATG} / *frK*_{DW} a permis l'obtention, à partir de l'ADN génomique de *B. longum* A10C, d'un produit de PCR qui correspond sur gel d'agarose à 2% à une seule bande d'environ 553 pb, correspondant à la taille théorique attendue (Figure RD 8, page 125, piste 1). Le couple d'oligonucléotides *frK*_{UP} / *frK*_{TAA} conduit à un produit d'amplification d'environ 338 pb, ce qui est également en concordance avec la taille théorique attendue (Figure RD 8, page 125, piste 3).

La séquence nucléotidique complète de 894 pb a été obtenue en utilisant comme amorces le couple d'oligonucléotides *frK*_{ATG} / *frK*_{TAA} (Figure RD 8, page 125, piste 2). Ce fragment d'ADN a été cloné dans le vecteur de clonage pCR2.1 conduisant au plasmide pFrK1. La souche d'*E. coli* DH5 α a été utilisée pour conserver et produire en quantité le plasmide pFrK1. Le séquençage de l'insert de 894 pb (Figure RD 8, page 125) confirme la taille de l'amplicon.

II. 2. 2. 2. Analyse de séquence

Une analyse bioinformatique a révélé 98% d'homologie en séquence nucléotidique et 97.6 % d'identité de séquence en acides aminés entre le cadre de lecture clonée à partir de *B. longum* A10C et les deux séquences de *B. longum* précédemment analysées (Figure RD 9, page 126). La majorité (59%) des modifications constatées dans la séquence nucléotidique de *frK* de *B. longum* A10C (10 nucléotides) n'ont pas de répercussions sur la structure primaire de la protéine (Figure RD 9, page 126). Les sept acides aminés qui diffèrent entre la séquence de FrK des trois souches sont présentés dans le Tableau RD4, page 127. Trois modifications dans séquence primaire, localisées dans la partie centrale de la molécule, pourraient avoir des conséquences sur la charge globale de la protéine (valine, V₁₆₈ au lieu d'alanine A₁₆₈, aspartate D₂₀₅ au lieu de glycine G₂₀₅ et phénylalanine F₂₇₃ au lieu de tyrosine Y₂₇₃). Toutefois, le point isoélectrique calculé de la protéine reste acide (pI 5). Nulle modification dans la séquence en acides aminés n'a été constatée au niveau des motifs PfkB (I et II), considérés responsables de l'activité catalytique de la protéine (Figure RD 6, page 120).

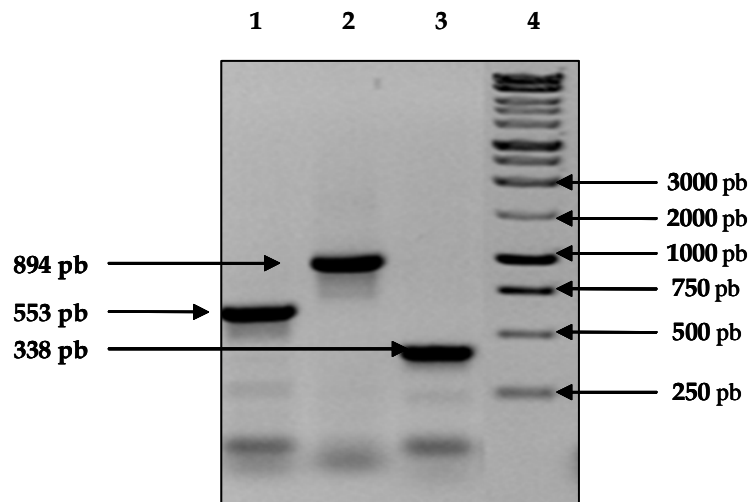


Figure RD 8. Profil de séparation des produits d'amplification obtenus par PCR lors de l'amplification de l'ADN_g de *Bifidobacterium longum* A10C par les couples d'amorces suivants: *frK*_{ATG}/*frK*_{DW} (piste 1), *frK*_{ATG}/*frK*_{TAA} (piste 2), *frK*_{UP}/*frK*_{TAA} (piste 3). Piste 4, témoin de masse moléculaire (Promega). La séparation des bandes d'ADN a été réalisée sur gel d'agarose à 1,5 %, dans du tampon TBE.

M T T P I V L S L G E L L W D M L P S G K R A G
ATG ACT ACC CCG ATC GTT CTG AGC CTC GGT GAA CTG CTG TGG GAC ATG CTG CCG AGC GGC AAG CGA GCC GGC
M T T P I V L S L G E L L W D M L P S G K R A G
ATG ACT ACC CCG ATC GTT CTG AGC CTC GGT GAA CTG CTG TGG GAT ATG CTG CCG AGC GGC AAG CGA GCC GGC
M T T P I V L S L G E L L W D M L P S G K R A G
ATG ACT ACC CCG ATC GTT CTG AGC CTC GGT GAA CTG CTG TGG GAT ATG CTG CCG AGC GGC AAG CGA GCC GGC
G A P V N F A Y H A M K N G T E G W A I S A V G
GGC GCC CCC GTC AAC TTC GCC TAC CAC GCG ATG AAG AAC GGC ACC GAA GGC TGG GCC ATC AGC GCG GTC GGC
G A P V N F A Y H A M K N G T E G W A I S A V G
GGC GCC CCC GTC AAC TTC GCC TAC CAC GCG ATG AAG AAC GGC ACC GAA GGC TGG GCT ATC AGC GCG GTC GGC
G A P V N F A Y H A M K N G T E G W A I S A V G
GGC GCC CCC GTC AAC TTC GCC TAC CAC GCG ATG AAG AAC GGC ACC GAA GGC TGG GCC ATC AGC GCG GTC GGC
E D E L G D E L I A K A N E A G I N T V I Q R N
GAG GAT GAA CTC GGC GAC GAA CTG ATT GCC AAG GCC AAC GAG GCC GGT ATC AAC ACC GTC ATC CAG CGC AAT
E D E L G D E L I A K A N E A G I N T V I Q R N
GAG GAT GAG CTC GGC GAC GAA CTG ATT GCC AAG GCC AAC GAG GCC GGC ATC AAC ACC GTC ATC CAG CGC AAC
E D E L G D E L I A K A N E A G I N T V I Q R N
GAG GAT GAA CTC GGC GAC GAA CTG ATT GCC AAG GCC AAC GAG GCC GGC ATC AAC ACC GTC ATC CAG CGC AAC
A W P T S T V E V A L K N G I P E Y T I V K G V
GCC TGG CCG ACC TCC ACC GTC GAG GTC GCA CTG AAG AAC GGC ATC CCG GAG TAC ACC ATC GTC AAG GGC GTG
A W P T S T V E V A L K N G I P E Y T I V K G V
GCC TGG CCG ACC TCC ACC GTC GAG GTC GCG CTG AAG AAC GGC ATC CCG GAG TAC ACC ATC GTC AAG GGC GTG
A W P T S T V E V A L K N G I P E Y T I V K G V
GCC TGG CCG ACC TCC ACC GTC GAA GTC GCG CTG AAG AAC GGT ATC CCG GAG TAC ACC ATC GTC AAG GGC GTG
A W D H I L Y T R Q L I D V V S K A D A V C F G
GCT TGG GAC CAC ATC CTG TAC ACC CGC CAG CTC ATC GAC GTG GTC TCC AAG GCC GAC GCC GTC TGC TTC GGC
A W D H I L Y T R Q L I D V V S K A D A V C F G
GCT TGG GAC CAC ATC CTG TAC ACC CGC CAG CTC ATC GAC GTG GTC TCC AAG GCT GAC GCC GTC TGC TTC GGC
A W D H I L Y T R Q L I D V V S K A D A V C F G
GCT TGG GAT CAC ATC CTG TAC ACC CGC CAG CTC ATC GAC GTG GTC TCC AAG GCC GAC GCC GTC TGC TTC GGC
T L A L R S P E S H A T I T E L L K H T K P G A
ACC CTG GCC CTG CGC TCC CCC GAA TCG CAC GCC ACC ATC ACG GAG CTG CTC AAG CAC ACC AAG CCG GGC GCG
T L A L R S P E S H A T I T E L L K H T K P G A
ACC CTG GCC CTG CGC TCC CCC GAA TCG CAC GCC ACC ATC ACG GAG CTG CTC AAG CAC ACC AAG CCG GGC GCG
T L A L R S P E S H A T I T E L L K H T K P G A
ACC CTG GCC CTG CGC TCC CCC GAA TCG CAC GCC ACC ATC ACG GAG CTG CTC AAG CAC ACC AAG CCG GGC GCG
M K F F D I N L R G D H Y S K E L I E E L L K A
ATG AAG TTC TTC GAC ATC AAC CTG CGT GGC GAC CAC TAC TCC AAG GAA CTT ATC GAG GAA CTC CTC AAG GCG
M K F F D I N L R G D H Y S K E L I E E L L K A
ATG AAG TTC TTC GAC ATC AAC CTG CGC GGC GAC CAC TAC TCC AAG GAG CTT ATC GAG GAA CTC CTC AAG GTG
A T V F K I N D E E L L L L R D M F D I R G T S
GCC ACC GTC TTC AAG ATC AAC GAC GAG GAA CTC CTG CTG CTG CGC GAC ATG TTC GAC ATC CGC GGC ACC TCC
A T V F K I N D E E L L L L R D M F D I R G T S
GCC ACC GTC TTC AAG ATC AAC GAC GAG GAA CTC CTG CTG CTG CGC GAC ATG TTC GAC ATC CGC GGC ACC TCC
A T V F K I N D E E L L L L R D M F D I R G T S
GCC ACC GTC TTC AAG ATC AAC GAC GAG GAA CTC CTG CTG CTG CGC GAC ATG TTC GAC ATC CGC GGC ACC TCC
G E D A S R W F I E E F G L D Y V I L T A G S A
GGC GAA GAT GCC TCC CGC TGG TTC ATC GAG GAA TTC GGC CTT GAC TAC GTG ATT CTG ACC GCC GGC TCC GGC
G E D A S R W F I E E F G L D Y V I L T A G S A
GGC GAA GAT GCC TCC CGC TGG TTC ATC GAG GAA TTC GGC CTT GAC TAC GTG ATT CTG ACC GCC GGC TCC GGC
G E D A S R W F I E E F G L D Y V I L T A G S A
GGC GAA GAT GCC TCC CGC TGG TTC ATC GAG GAA TTC GGC CTT GAC TAC GTG ATT CTG ACC GCC GGC TCC GGC
G E D A S R W F I E E F G L D Y V I L T A G S A
GGC GAA GAT GCC TCC CGC TGG TTC ATC GAG GAA TTC GGC CTT GAC TAC GTG ATT CTG ACC GCC GGC TCC GGC
Y S T I I S R K G E V S T L D T P H V E V N D T
TAC TCC ACC ATC ATC TCC CGC AAG GGC GAG GTC TCC ACG CTG GAC ACT CCG CAC GTC GAG GTG AAC GAC ACC
Y S T I I S R K G E V S T L D T P H V E V N D T
TAC TCC ACC ATC ATC TCC CGC AAG GGC GAG GTC TCC ACG CTG GAC ACT CCG CAC GTC GAG GTG AAC GAC ACC
Y S T I I S R K G E V S T L D T P H V E V N D T
TAC TCC ACC ATC ATC TCC CGC AAG GGC GAG GTC TCC ACG CTG GAC ACC CCG CCG GTC GAG GTG AAC GAC ACC
V G A G D S F S G T F T A R I L L G D T L A E A
GTG GGT GCA GGT GAC TCC TTC TCC GGC ACC TTC ACC GCC CGC ATC CTG CTG GGC GAC ACG CTC GCC GAA GCC
V G A G D S F S G T F T A R I L L G D T L A E A
CTG GGT GCG GGT GAC TCC TTC TCC GGC ACC TTC ACC GCC CGC ATC CTG CTG GGC GAC ACG CTG GCA GAA GCC
V G A G D S F S G T F T A R I L L G D T L A E A
GTC GGC GCA GGC GAC TCC TTC TCC GGC ACC TTC ACC GCA CGC ATC CTG CTG GGT GAC ACG CTC GCC GAA GCC
H R K A V N T A A Y V C T Q A G A W P Q Y P A E
CAC CGC AAG GCC GTC AAC ACC GCC TAC GTC TGC ACC CAG GCC GGT GCC TGG CCG CAG TAC CCG GCC GAG
H R K A V N T A A Y V C T Q A G A W P Q Y P A E
CAC CGC AAG GCC GTC AAC ACC GCC TAC GTC TGC ACC CAG GCC GGT GCC TGG CCG CAG TAC CCG GCC GAG
H R K A V N T A A Y V C T Q A G A W P Q Y P A E
CAC CGC AAG GCC GTC AAC ACC GCC TAC GTC TGC ACC CAG GCC GGT GCC TGG CCG CAG TAC CCG GCC GAG
M P D Y L A E I G K B. longum DJ010A
ATG CCC GAC TAT CTG GCT GAA ATC GGC AAG
M P D Y L A E I G K B. longum NCC2705
ATG CCC GAC TAT CTG GCT GAA ATC GGC AAG
M P D Y L A E I G K B. longum A10C
ATG CCC GAC TAT CTG GCT GAA ATC GGC AAG

Figure RD 9. Alignement des séquences nucléotidiques et protéiques d'une fructokinase putative identifiée chez trois souches de *B. longum*. Les nucléotides et les acides aminés qui diffèrent entre les trois souches sont respectivement soulignés et encadrés par un rectangle.

Tableau RD 4. Variations de séquence en acides aminés des fructokinases produites par trois souches de *B. longum* (A10C, NCC2705 et DJ010A). Les variations locales de l'index de polarité (IP) de la protéine FrK de *B. longum* A10C (IP₁) par rapport aux séquences homologues de *B. longum* (NCC2705 ou DJ010A) déposées dans les banques de données (NP_696503.1 et AAN25139.1, respectivement) (IP₂) sont calculées selon les données de Kyte et Doolittle (1982).

<i>B. longum</i> A10C	<i>B. longum</i> NCC2705	<i>B. longum</i> DJ010A	IP ₁ /IP ₂
D ₆₁	N ₆₁	N ₆₁	-3.5/-3.5
L ₆₉	I ₆₉	I ₆₉	+3.8/+4.5
V ₁₆₈	A ₁₆₈	A ₁₆₈	+4.2/+1.8
L ₂₀₁	I ₂₀₁	I ₂₀₁	+3.8/+4.5
D ₂₀₅	G ₂₀₅	G ₂₀₅	-3.5/-0.4
F ₂₇₃	Y ₂₇₃	Y ₂₇₃	+2.8/-1.3
E ₂₈₄	Q ₂₈₄	Q ₂₈₄	-3.5/-3.5

II. 3. Test d'activité enzymatique de la protéine FrK produite en système hétérologue chez *E. coli* (Fru)

L'analyse par restriction du vecteur pFrK1 a montré que le promoteur *plac* présent sur le plasmide pCR2.1 et l'insert de 894 pb se trouvaient dans une même orientation, ce qui pourrait permettre l'expression du gène *frK*. Par conséquent, comme la souche *E. coli* DH5 α présente un phénotype Fru⁻, cette construction a été testée pour mettre en évidence une éventuelle activité fructokinase.

Pour réaliser des mesures d'activité enzymatique, l'extrait cellulaire de cette souche a été incubé avec du fructose et analysé en chromatographie d'échange d'ions (HPAEC-PAD). Les chromatogrammes illustrant la phosphorylation du fructose par l'extrait cellulaire d' *E. coli* DH5 α contenant le plasmide pFrK1 sont caractérisés par un pic dû au fructose non-transformé ($t_R=3,5$), ainsi que par cinq autres pics correspondant au produits de fermentation du fructose par la voie de la glycolyse (Figure RD 10, page 129) dont le glucose-6-P ($t_R= 22,5$), le fructose-6-P ($t_R= 24,5$), le fructose-1,6-diphosphate ($t_R= 32,7$). Afin de discerner entre l'activité enzymatique liée à la protéine FrK et les transformations catalysées par les enzymes d'*E. coli*, deux témoins négatifs ont été réalisés (Figure RD 10, page 129). Ainsi, les extraits cellulaires d'*E. coli* renfermant le vecteur pCR2.1, incubés avec et sans fructose ont également été analysés par HPAEC-PAD. Les résultats confirment que l'activité fructokinase observée est uniquement liée au produit du gène *frK* (Figure RD 10, page 129).

On peut donc conclure que FrK code pour une protéine qui a une activité fructokinase.

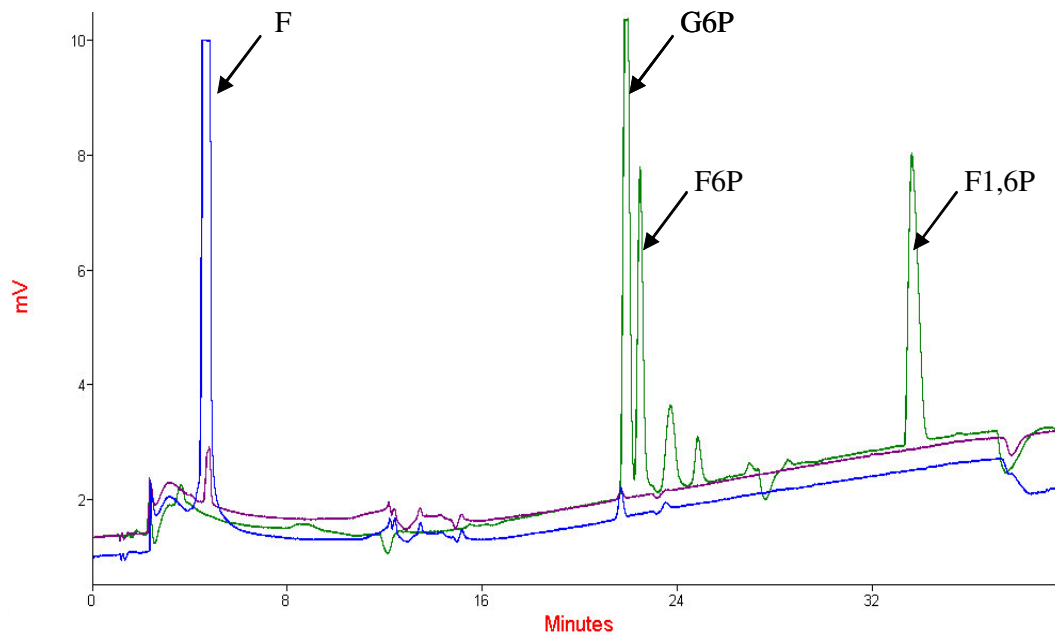


Figure RD 10. Complémentation *in vivo* de la souche d'*E. coli* DH5α (Fru^-) par le gène *frK* de *B. longum* A10C. Analyse HPAEC-PAD des produits saccharidiques obtenus lors de l'incubation de l'extrait cellulaire d'*E. coli* DH5α-pCR2.1-*frK* (courbe en vert), d'*E. coli* DH5α-pCR 2.1 (courbe en bleu) et d'*E. coli* DH5α (courbe en violet) en présence de fructose (1 g/L). Les pics correspondant au fructose (F), glucose-6-phosphate (G6P), fructose-6-phosphate (F6P) et au fructose-1,6-diphosphate sont indiqués par une flèche.

Chapitre III. Purification et caractérisation des paramètres enzymatiques de la protéine FrK de *B. longum* A10C

III. 1. Généralités

Afin de surproduire une protéine recombinante chez *E. coli*, l' ORF complet codant pour FrK a été cloné dans un vecteur d'expression (pET28, Novagen) qui permet la synthèse des protéines en fusion avec un peptide contenant six résidus d'histidine en position N-terminale. La protéine recombinante et le peptide sont séparés par une séquence de cinq résidus d'acides aminés (valine-proline-arginine-glycine-serine) reconnue spécifiquement par une protéase (la thrombine), ce qui permet l'élimination des six résidus histidine après purification.

III. 2. Clonage de l'amplicon de 894 pb dans le vecteur d'expression pET28

Par l'amplification de la séquence de 894 pb par le couple d'oligonucléotides *frK*_{NdeI}/*frK*_{BamHI} (Tableau RD 3, page 123), deux sites de restriction (*NdeI* et *BamHI*) ont été créés, conservant les codons d'initiation et de fin de traduction. L'amplicon a ensuite été soumis à une digestion complète par les endonucléases *NdeI* et *BamHI*. Le produit de digestion a été ligué avec le vecteur pET28 linéarisé par les mêmes enzymes. Le plasmide obtenu (pFrK2) a été utilisé pour transformer deux souches d'*E. coli* : NM522 (pour le maintien du plasmide) et BL21 (DE3) (Stratagene) pour la production de la protéine recombinante. L'initiation de la transcription du cadre de lecture par l'ARN T7 polymérase a été réalisée à partir d'une séquence promoteur déjà présente sur le plasmide pET28.

III. 3. Induction de la synthèse de l'ARN T7 polymérase par l'IPTG

Une préculture (5 mL) de cellules d'*E. coli* BL21 (DE3) transformées par le plasmide pFrK2 a servi d'inoculum pour 250 mL de milieu LB/Kan. Lorsque les bactéries sont arrivées en phase exponentielle de croissance (absorbance $\lambda_{600} \approx 0,3$ à 0,35, soit ≈ 2 h de culture), l'IPTG est ajouté dans le milieu, à une concentration finale de 1mM. Une étude cinétique (de une à huit heures d'induction) nous a permis de déterminer la durée optimale d'induction. Dans ce but, des échantillons (1 mL) de culture bactérienne ont été prélevés toutes les 60 minutes. L'extrait cellulaire, préparé comme décrit dans Matériels et Méthodes (cf. § V. 1. 2., page 93) a été analysé par SDS-PAGE. Un témoin négatif de ligation (une culture de BL21 transformée par pET28) a été également analysé par la même technique. Par visualisation des fractions protéiques séparées par SDS-PAGE, nous avons constaté que l'induction de l'ARN T7 polymérase, et la biosynthèse de la protéine FrK, sont maximales après 2h de culture.

III. 4. Purification de la protéine FrK par chromatographie d'affinité

La protéine FrK est soluble et sa purification est réalisée par chromatographie d'affinité. L'éluion utilise une solution d'imidazole (150 mM) dans du tampon phosphate de sodium (0,1M, pH 8). Les 13 résidus d'acides aminés ont été éliminés par clivage du peptide de fusion par une thrombine biotinylée, selon les instructions du kit de purification (Thrombin Cleavage/Capture Kit, Novagen). La queue de polyhistidines a été éliminée par filtration sur une membrane de porosité 10 kDa.

Pour mettre en évidence les différentes étapes de purification de la fructokinase de *B. longum* A10C nous avons analysé par SDS-PAGE quatre fractions protéiques (1 µg de protéine soluble/ piste) (Figure RD 11, page 132). L'extrait cellulaire de la souche *Escherichia coli* BL21 transformée par le plasmide pET28 (piste 2) est caractérisé par de très nombreuses bandes protéiques de faible intensité. Cela permet de constater que l'inducteur utilisé (l'IPTG) ne modifie pas le taux de synthèse des protéines bactériennes. L'analyse du profil de séparation des protéines présentes dans l'extrait enzymatique de la même souche bactérienne transformée par le plasmide pFrK2 montre une bande supplémentaire située à 33 kDa environ et qui représente la fraction protéique majoritaire. La protéine chimérique pure, en fusion avec le peptide polyhistidine peut être visualisée sur la piste 3. La protéine FrK pure, obtenue après clivage de la queue polyhistidine par la thrombine biotinylée se présente sous la forme d'une seule bande, de masse moléculaire légèrement inférieure par rapport à la fraction protéique précédente (Figure RD 11, piste 4, page 132).

La protéine ainsi purifiée a été utilisée pour déterminer les paramètres enzymatiques.

III. 5. Etude biochimique d'une fructokinase de *B. longum* A10C

III. 5. 1. Gamme étalon et choix de l'unité de concentration

Une étude de la variation de l'absorbance ($\lambda=340$ nm) en fonction de la concentration de sept différentes solutions de fructose-6-phosphate a été réalisée (Figure RD 12, page 133). Cette gamme étalon permet de corréliser une valeur d'absorbance optique (A) avec la quantité de fructose-6-phosphate formé lors de la réaction catalysée par la protéine FrK. Cela permet également le choix de l'unité de concentration pour la solution de F6P (nM).

III. 5. 2. Influence de la quantité de protéine sur l'activité enzymatique

La variation de l'apparition du F6P en fonction de la quantité d'enzyme utilisée a été mesurée par spectrophotométrie ($\lambda=340$ nm). (Figure RD 13, page 134). La courbe de variation présente deux régions distinctes (Figure RD 13, page 134):

- lorsque la concentration en enzyme augmente de 0,2 à 0,6 µg/mL, la variation de l'absorbance est linéaire (0 à 1,10 unités de d'absorbance);
- au delà de 0,8 µg de protéine utilisée, la courbe de variation présente un plateau (1,16 à 1,3 unités de DO). Ce résultat peut être lié aux quantités limitantes en substrats (fructose ou ATP) ou en cofacteur (Mg^{2+} , nécessaire à la mise en conformation de l'ATP).

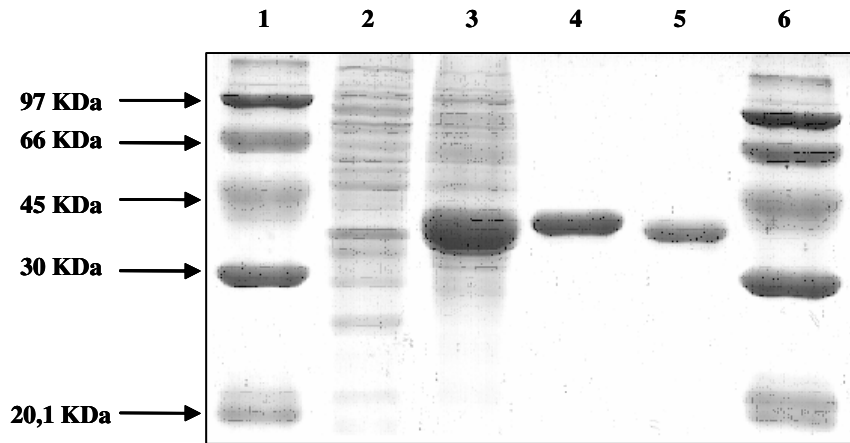


Figure RD 11. Profil de séparation par SDS-PAGE des fractions protéiques obtenues lors de différentes étapes de purification de la protéine FrK. Pistes 1 et 6, témoin de masse moléculaire. Piste 2, extrait cellulaire d'*E. coli* BL21-pET28. Piste 3, extrait cellulaire d'*E. coli* BL21-pET28 -*frK*. Piste 4, protéine chimérique FrK fusionnée avec la queue de six résidus histidine. Piste 5, protéine FrK pure, après digestion par la thrombine.

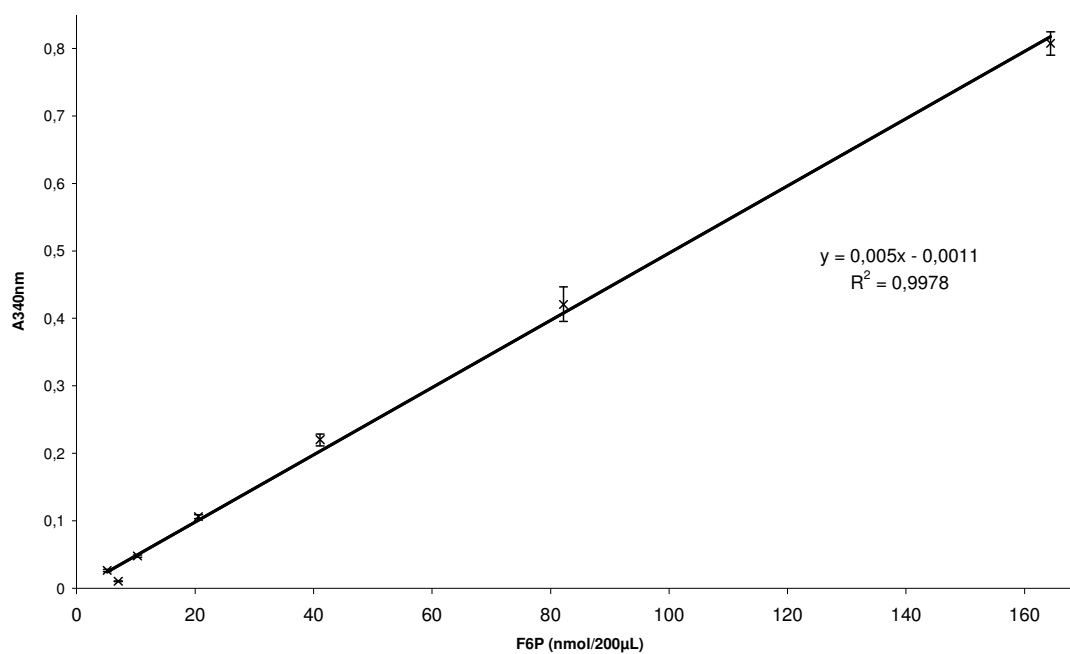


Figure RD 12. Variation de l'absorbance optique ($\lambda=340$ nm) en fonction de la quantité de fructose-6 phosphate.

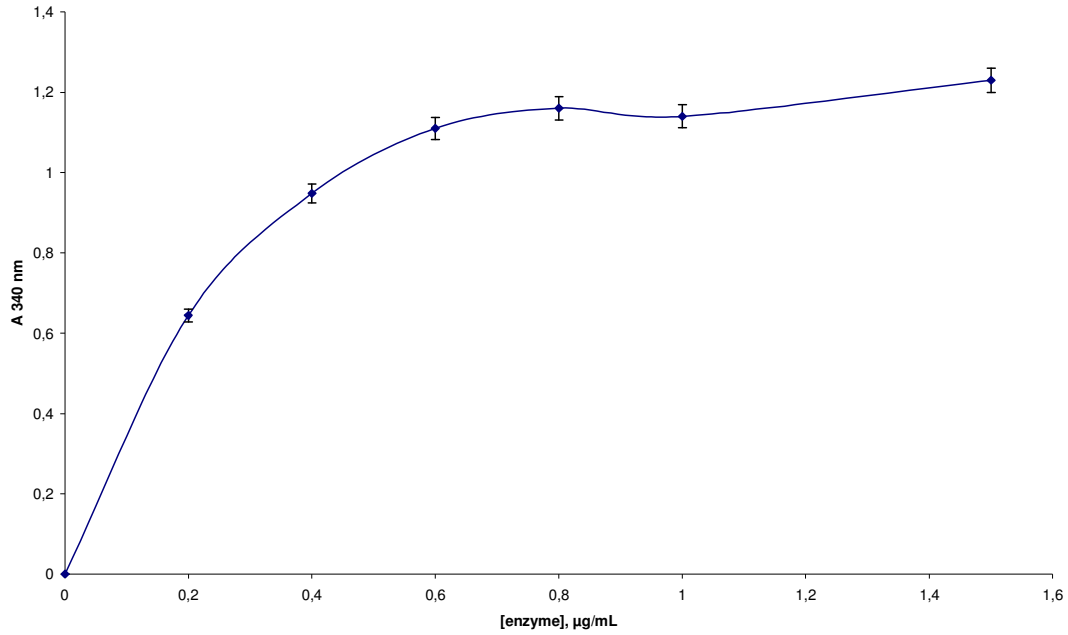


Figure RD 13. Variation de l'absorbance optique (A) en fonction de la quantité d'enzyme utilisée. Le fructose (2,7 mM) a été incubé dans du tampon phosphate (0,1 mM, pH 6), contenant du $MgCl_2$ (10 mM) et de l'ATP (10 mM) pendant 10 minutes à 37°C. Chaque point représente la moyenne de trois expériences différentes.

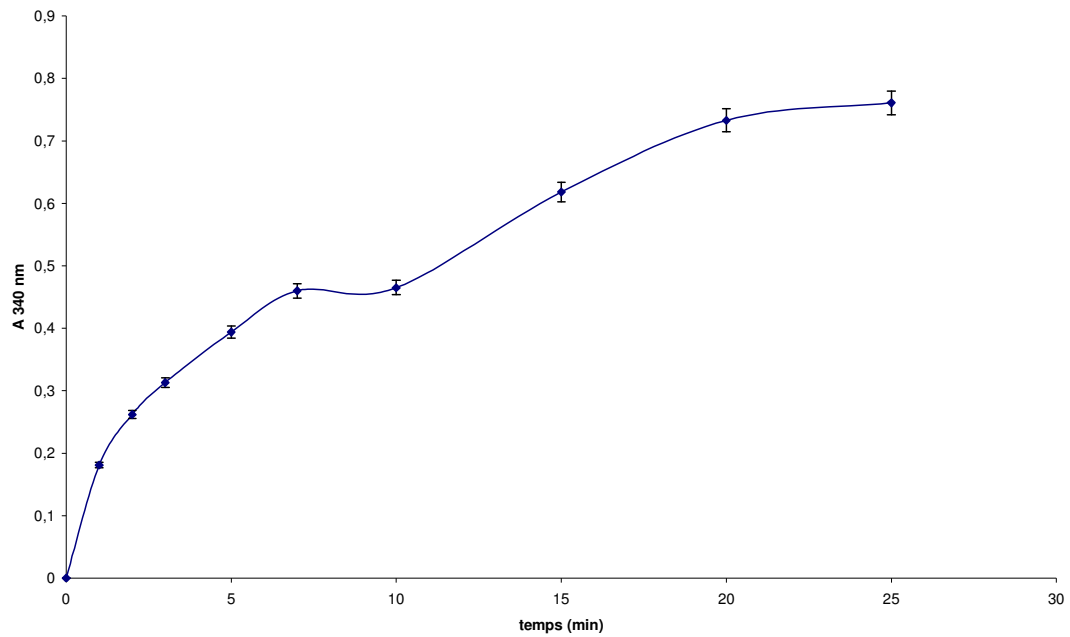


Figure RD 14. Variation de l'absorbance optique (A) en fonction du temps d'incubation. Le fructose (2,7 mM) a été incubé dans du tampon phosphate (0,1 mM, pH 6), contenant du $MgCl_2$ (10 mM), de l'ATP (10 mM) et de la fructokinase (0, 22 $\mu g/mL$) pendant 0 à 25 minutes à 37°C. Chaque point représente la moyenne de trois expériences différentes.

La quantité de protéine choisie pour toutes les investigations ultérieures (0,2 µg/mL) correspond au domaine de variation linéaire.

III. 5. 3. Influence du temps d'incubation sur l'activité enzymatique

La variation de l'absorbance en fonction du temps d'incubation est linéaire si la réaction enzymatique ne dépasse pas 5 minutes (Figure RD 14, page 135). Si l'expérience est prolongée de deux minutes, on constate une augmentation de l'absorbance de 8%

Les facteurs limitant la réaction enzymatique seraient liés soit à la transformation totale d'un/des substrat(s) en produit(s), soit à l'utilisation complète du Mg^{2+} disponible dans le tampon d'incubation. L'analyse de la variation de l'absorbance optique après rajout de chacun de ces molécules (fructose, ATP, $MgCl_2$, respectivement) pourrait indiquer le(s) facteur(s) limitant la réaction enzymatique.

III. 5. 4. Influence du pH sur l'activité enzymatique. Optimum de pH

Pour des valeurs de pH du tampon d'incubation comprises entre 3 et 4,8 (tampon citrate) il n'y a pas de phosphorylation du fructose (Figure RD 15, page 137). Une augmentation du pH d'une unité (de 4,8 à 5,7) induit une augmentation d'absorbance de 50% (de 0,037 à 0,144 unités d'absorbance).

Cette variation d'activité enzymatique est encore plus évidente si le tampon citrate est remplacé par le tampon phosphate (Figure RD 15, page 137). Dans ce dernier cas on obtient 0,9 unités d'absorbance à pH 5,13, alors que le maximum d'activité ($A=1,114$) correspond au pH 5,95. Une légère diminution de la concentration des ions H_3O^+ (pH 6,47) entraîne une baisse de l'activité enzymatique ($A=1,10$), alors qu'une modification plus importante du pH (pH 8,7) détermine une chute d'activité de 40% ($A=0,62$).

La variation de l'activité fructokinase en fonction du pH se réalise selon la courbe de Gauss, avec un maximum de phosphorylation à pH 6 (pH optimum).

III. 5. 5. Influence de la température sur la réaction enzymatique. Optimum de température

La variation de l'activité fructokinase en fonction de la température d'incubation se fait toujours selon la courbe de Gauss (Figure RD 16, page 138). L'enzyme est fonctionnelle à 6°C (0,274 unités d'absorbance soit 16% par rapport au maximum d'activité), son activité augmente entre 15 et 43°C et atteint un maximum ($A=1,122$) à 50°C (Figure RD 16, page 138).

Une modification de la température de 5°C (de 50 à 55°C) entraîne une perte d'activité de 60%. A 60°C l'activité fructokinase est comparable avec celle constatée à 6°C (20% par rapport au maximum d'activité).

III. 5. 6. Etude de la stabilité enzymatique à différentes températures

Une incubation de l'enzyme à 50°C (l'optimum de température) pendant 15 minutes détermine une perte d'activité de 50% (Figure RD 17, page 139). Si la fructokinase subit le même traitement à 60°C, elle est totalement inactivée, alors qu'il n'y a que 10% de perte

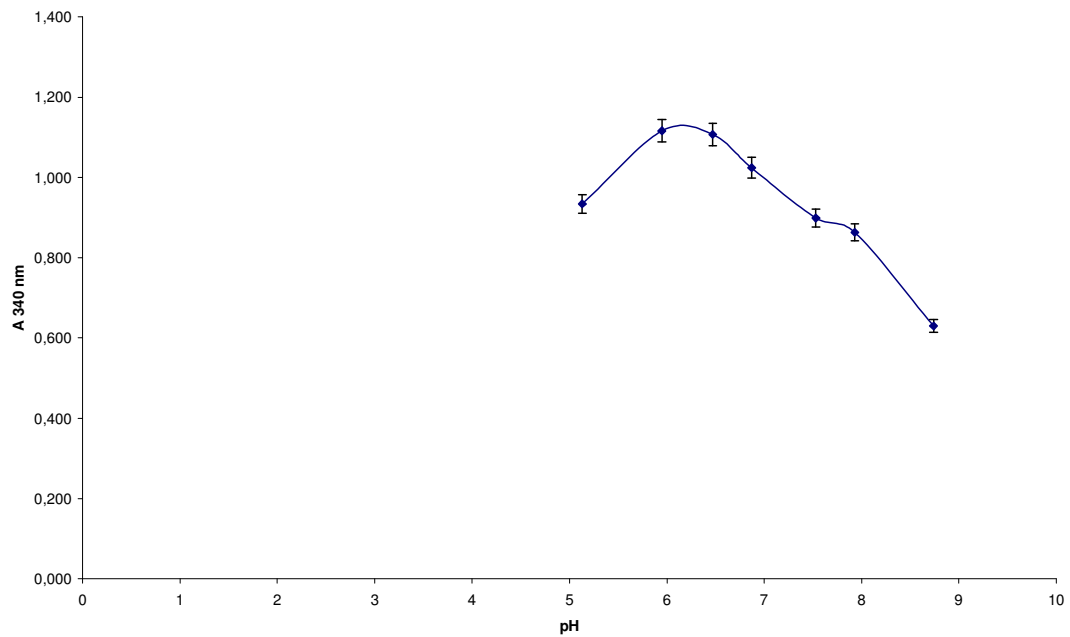


Figure RD 15. Variation de l'absorbance optique (A) en fonction du pH du tampon d'incubation. Le fructose (2,7 mM) a été incubé dans du tampon phosphate (0,1 mM) contenant du $MgCl_2$ (10 mM), de l'ATP (10 mM) et de la fructokinase (0,22 $\mu g/mL$) pendant 5 minutes à 50°C. Chaque point représente la moyenne de trois expériences différentes.

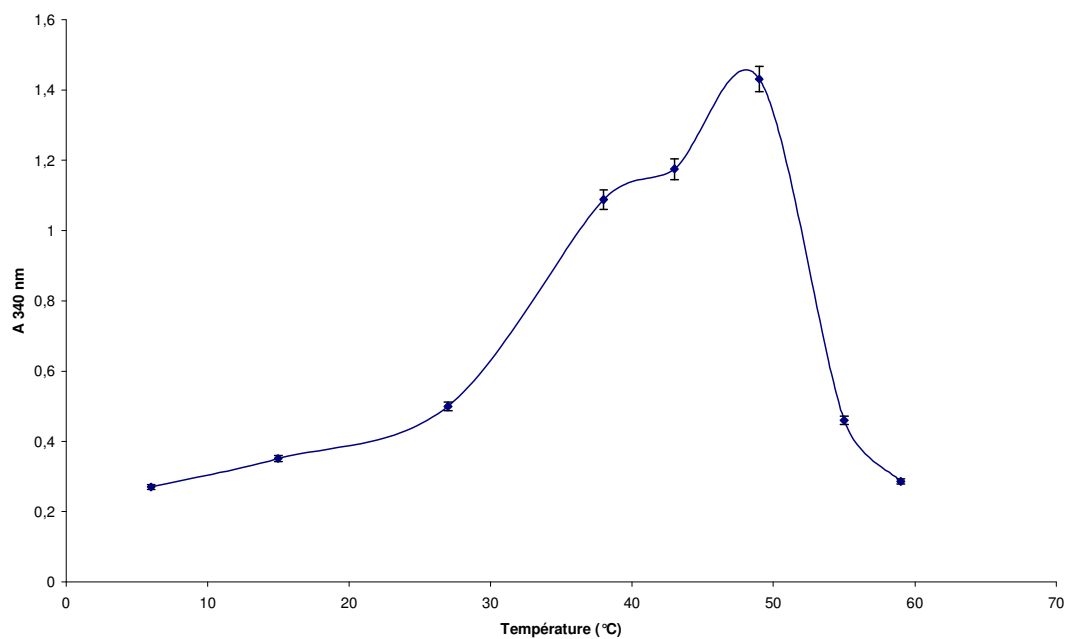


Figure RD 16. Variation de l'absorbance optique (A) en fonction de la température d'incubation. Le fructose (2.7 mM) a été incubé dans du tampon phosphate (0.1 mM, pH 6.5) contenant du $MgCl_2$ (10 mM), de l'ATP (10 mM) et de la fructokinase (0.22 μ g/mL) pendant 5 min au températures variant de 6 à 59°C. Chaque point représente la moyenne de trois expériences différentes.

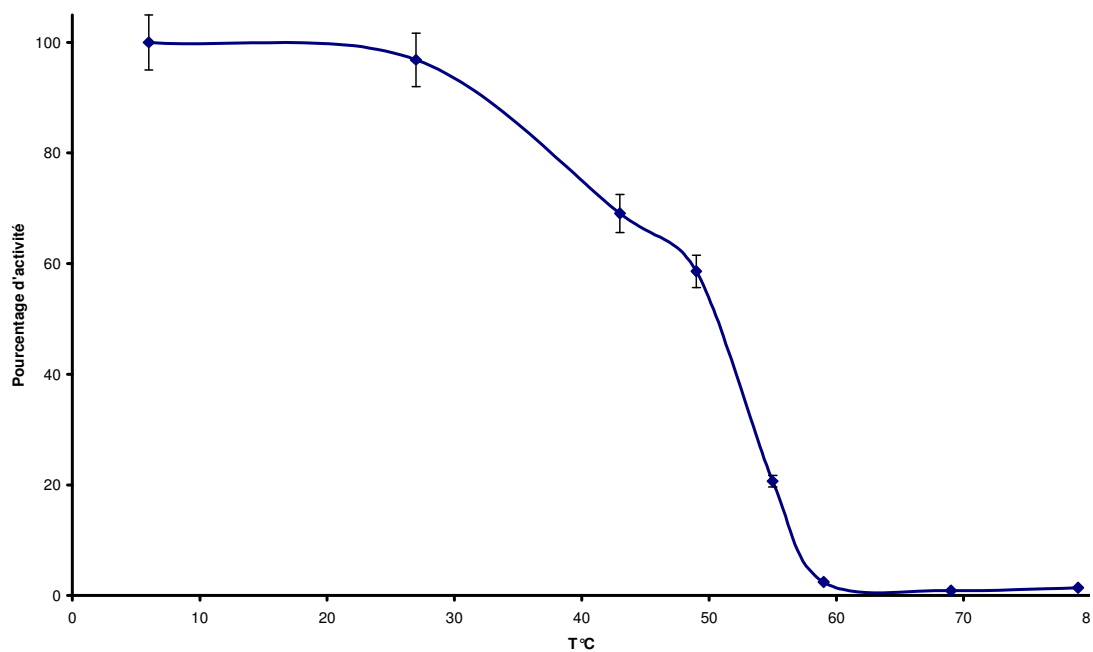


Figure RD 17. Variation de l'absorbance optique (A) en fonction de la stabilité enzymatique. Le fructose (2,7 mM) a été incubé dans du tampon phosphate (0,1 mM) contenant du $MgCl_2$ (10 mM), de l'ATP (10 mM) et de la fructokinase (0,22 μ g/mL) pendant 10 min à 50°C. Chaque point représente la moyenne de trois expériences différentes.

d'activité si la protéine est incubée à la température ambiante (27°C). Le stockage prolongé (de deux à quatre semaines) à 6°C ne modifie pas significativement l'activité.

III. 5. 7. Discussion

La fructokinase recombinante de *Bifidobacterium longum* A10C a un pH optimum de 6 et une température optimale de 50°C. L'enzyme est stable à 6°C, mais des températures négatives ou supérieures à 30°C entraînent une perte d'activité.

Une unité d'activité fructokinase est définie comme la quantité d'enzyme (exprimée en mg) nécessaire pour l'obtention d'une nmole de fructose-6-phosphate par minute, à 37°C.

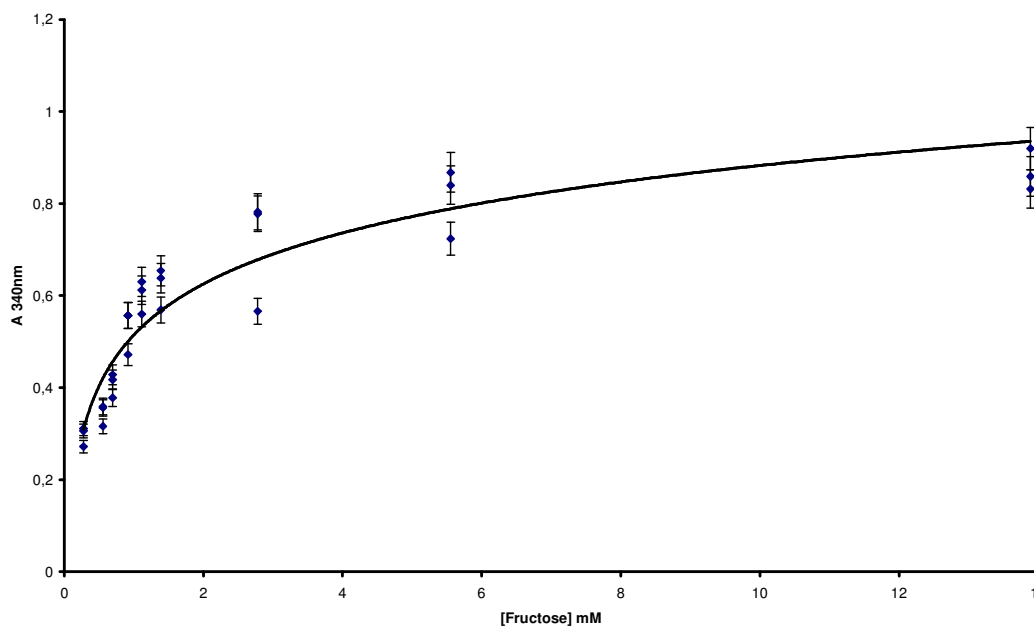
Cette étude préliminaire nous a permis de mettre au point les conditions de dosage d'activité fructokinasiq : temps d'incubation (5 minutes), quantité d'enzyme à utiliser (0,22µg/mL), pH (6) et température (50°C), afin de pouvoir étudier ses paramètres cinétiques (K_M , V_M).

Il est par ailleurs intéressant d'observer que toutes les fructokinases décrites dans la littérature possèdent des températures optimales d'action comprises entre 22°C et 37°C. Seule la fructokinase purifiée à partir de *B. longum* A10C présente un maximum d'activité à 50°C. Cette valeur n'est toutefois pas surprenante pour une enzyme provenant de *Bifidobacterium* sp. En effet, nous avons constaté au laboratoire que deux autres enzymes, notamment une β -D-galactosidase et une N-acétyl β -D-hexosaminidase purifiées à partir de *B. bifidum* DSM20082 possèdent des optima de température comprises entre 50 et 55°C (Dumortier *et al.*, 1994 ; Derensy-Dron *et al.*, 1999). Il apparaît ainsi qu'entre la température physiologique de croissance des bifidobactéries (37 à 39°C) et la température optimale d'action de ces enzymes il existerait un écart d'environ 15°C. Pour la fructokinase de *B. longum* A10C, cette observation est à corrélér, avec la faible stabilité de l'enzyme à 50°C. On peut donc conclure que l'incubation de la protéine FrK pure à 50°C induit une succession de modifications dans la conformation de cette protéine. Par exemple, dans les 5 premières minutes, ces modifications correspondent à un maximum de transfert des résidus phosphate de l'ATP vers le D-fructose (maximum d'activité fructokinasiq). Lorsque l'incubation est prolongée de 10 minutes, une perte de 50% d'activité est constatée.

Il est également intéressant d'observer que le pH optimum d'action des fructokinases bactériennes varie généralement entre 7 et 8. Par exemple, le pH optimum de la fructokinase de *B. subtilis* est de 7,7 (Chalumeau *et al.*, 1978). La fructokinase FrK de *Rhizobium leguminosarum* possède un pH optimum de 8 (Fennington et Hughes, 1996). Par contre, la fructokinase de *Streptomyces violaceoruber* présente un plateau de pH correspondant au maximum d'activité, situé dans le domaine alcalin (pH compris entre 8,8 et 10) (Sabater *et al.*, 1972). Au contraire, pour les fructokinases caractérisées chez les organismes eucaryotes (*pisum sativum*, *Catharanthus roseus*) le maximum d'activité à été observé pour des valeurs de pH comprises entre 6 et 6,5 (Medina et Sols, 1956 ; Yamashita et Ashihara, 1988).

Il apparaît donc que la protéine FrK de *B. longum* A10C est la seule fructokinase bactérienne décrite jusqu'à présent qui présente un maximum d'activité phosphotransférasique à pH acide (pH 6).

A)



B)

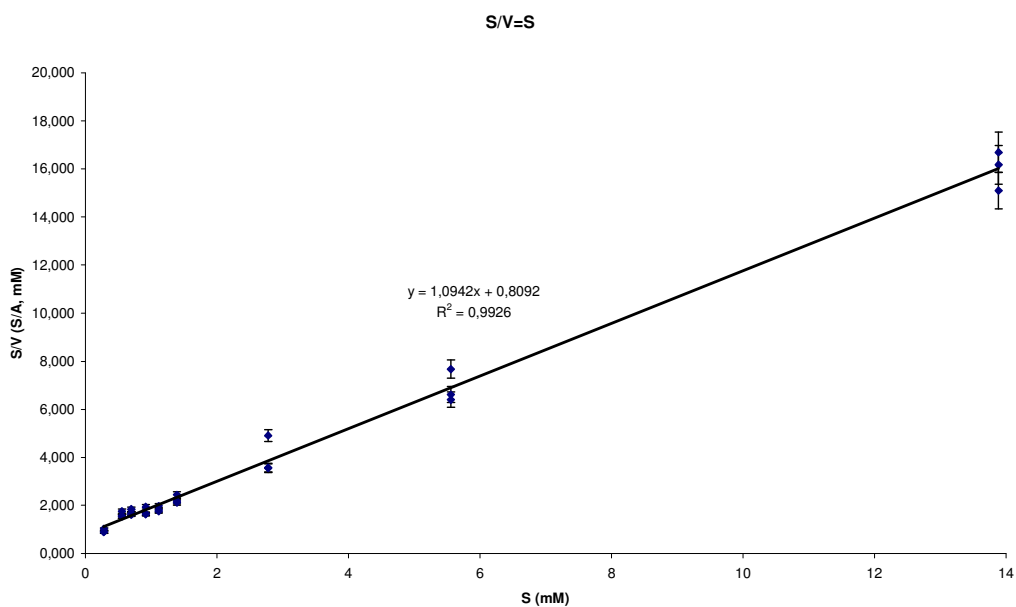


Figure RD 18. Analyse de l'influence du fructose sur l'activité enzymatique. **A)** Variation de l'absorbance optique en fonction de la concentration en fructose. **B)** Représentation de Hanes et Wolf.

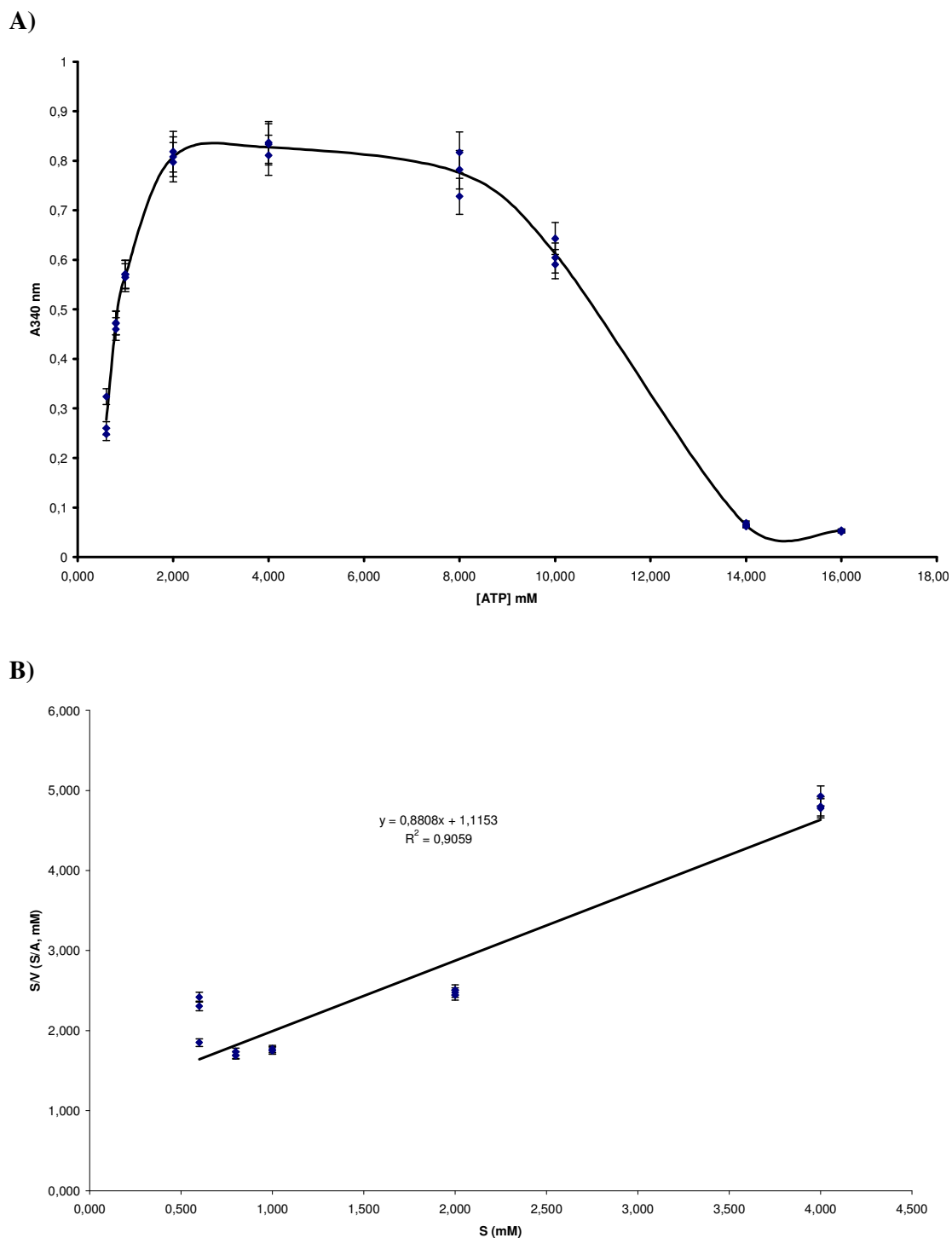


Figure RD 19. Analyse de l'influence de l'ATP sur l'activité enzymatique. **A)** Variation de l'absorbance optique en fonction de la concentration en ATP. **B)** Représentation de Hanes et Wolf.

III. 5. 8. Détermination des paramètres cinétiques K_M et V_M

III. 5. 8. 1. Résultats

La fructokinase réalise le transfert du résidu phosphoryle γ de l'ATP (substrat donneur) sur le résidu hydroxyle du carbone C-6 du fructose (substrat accepteur), en présence des ions Mg^{2+} comme cofacteurs. La représentation de l'activité fructokinase en fonction de la concentration en fructose ou en ATP selon l'équation de Hanes et Wolf nous a permis de déterminer la valeur des paramètres cinétiques K_M^{Fru} et V_M^{Fru} , respectivement K_M^{ATP} et V_M^{ATP} (Figures RD 18A, RD 18B, page 141 ; Figures RD 19A et RD 19B, page 142):

$$V_M^{Fru} = 0,84 \text{ nmol de fructose-6-phosphate formées/min/mg de protéine;}$$

$$K_M^{Fru} = 0,739 \text{ mM}$$

$$V_M^{ATP} = 1,8 \text{ nmol de fructose-6-phosphate formées/min/mg de protéine;}$$

$$K_M^{ATP} = 0,756 \text{ mM}$$

La courbe qui décrit la variation de l'apparition du F6P en fonction de la quantité de substrat présente deux régions distinctes. Pour des concentrations en fructose variant de 0,27 à 1 mM, la réaction de phosphorylation suit une évolution linéaire (Figure RD 18 A, page 141). A partir de 1 mM, la concentration en fructose influence peu ou pas la réaction enzymatique. En effet, lorsque la concentration en substrat saccharidique augmente 10 fois (de 1,38 mM à 13,8 mM), la quantité de F6P n'augmente que de 30%. Il n'y a donc pas d'inhibition de l'activité enzymatique par le fructose.

III. 5. 8. 2. Discussion

L'ATP influence l'activité enzymatique de trois manières différentes selon la concentration de ce substrat (Figure RD 19 A, page 142). L'intervalle des concentrations de 0,6 à 2 mM correspond à une augmentation linéaire de l'absorbance en fonction de la concentration en substrat nucléotidique. La densité optique évolue peu (4% de variation) lorsque la concentration en ATP augmente de 2 à 8 mM. Au-delà de 8 mM, l'ATP agit comme un inhibiteur de la réaction de phosphorylation du fructose. L'activité enzymatique à 10 mM ATP (en excès d'ATP) est comparable avec l'activité mesurée à 2 mM ATP (en conditions non saturantes).

Cet effet d'inhibition par excès d'ATP a déjà été observé chez deux fructokinases (OSFK1 et OSFK2) isolées à partir de *Oryza sativa* (Jiang *et al.*, 2003). Toutefois, aucune explication n'a été proposée pour ce phénomène. Notre hypothèse est qu'en excès de substrat nucléotidique il y aurait formation d'un complexe non productif de type enzyme-ATP-ATP. Cette supposition est soutenue par l'appartenance de la fructokinase FrK de *B. longum*A10C à la famille PfkB (famille des 1/6-phospho fructokinases). Selon Wu et collaborateurs (1991), ces enzymes possèderaient deux sites de fixation des substrats : un site de fixation de l'ATP (localisé au niveau de l'extrémité N-terminale de la protéine) et un site de fixation du fructose-1 (ou 6)-phosphate (localisé au niveau de l'extrémité C-terminale). Si l'interaction de la protéine avec le fructose-phosphate se fait par

l'intermédiaire du résidu phosphate, on peut imaginer qu'en excès d'ATP, FrK pourrait former un complexe de type FrK-ATP-ATP. Ce qui pourrait expliquer une diminution progressive de l'activité enzymatique pour des concentrations en ATP supérieures à 10 mM.

Dans le cas du fructose, la valeur de la constante de Michaelis (K_M^{Fru}) est comparable avec la valeur mesurée dans le cas de la fructokinase FrK de *Zymomonas mobilis* (0,75 mM) et de la mannofructokinase de *Streptococcus mutans* (0,63 mM) (Weisser *et al.*, 1996 ; Porter *et al.*, 1980). La fructokinase purifiée à partir de *Streptomyces violaceoruber* possède un K_M de 0,5 mM (Sabater *et al.* 1972). La réactivité la plus élevée envers le fructose a été constatée pour la fructokinase de *Bacillus subtilis* (0,15 mM) (Chalumeau *et al.*, 1978).

Dans le cas de l'ATP, la valeur de la constante de Michaelis (K_M^{ATP}) de la fructokinase n'a été déterminée que chez trois organismes : une bactérie à Gram négatif, *Fusobacterium mortiferum* (0,1mM), une bactérie à Gram positif, *Bacillus subtilis* (0,5 mM) et un organisme eucaryote, *Licopersicon esculentum* (0,13 mM) (Thompson *et al.*, 1992 ; Chalumeau *et al.*, 1978 ; Martines-Barajas *et al.*, 1997). Dans ces trois cas les valeurs de la constante de Michaelis sont inférieures à la valeur déterminée pour la fructokinase de *B. longum* A10C.

A partir de ces observations, on peut conclure que seule la fructokinase de *B. longum* A10C présente des valeurs identiques (0,7 mM) pour les constantes K_M^{Fru} et K_M^{ATP} . Ce résultat suggère que l'affinité de l'enzyme pour les deux substrats est similaire et que l'enzyme semble fonctionner selon un mécanisme de type Bi-Bi aléatoire.

La valeur du paramètre V_M^{Fru} a été déterminée uniquement pour deux fructokinases bactériennes et une fructokinase d'origine eucaryote. Dans tous les cas, ces valeurs sont supérieures à celle déterminée pour la protéine FrK de *B. longum* A10C. Ainsi, chez *Bacillus subtilis*, le V_M^{Fru} est de 83 nmoles de F6P/min/mg de protéine (Chalumeau *et al.*, 1978). La valeur déterminée chez *Fusobacterium mortiferum* est plus importante (74 μ moles/min/mg de protéine, Thompson *et al.*, 1992). La plus faible V_M^{Fru} a été mesurée pour la fructokinase FrK₂ de *Licopersicon esculentum* (50 nmoles/min/mg de protéine) (Martines-Barajas *et al.*, 1997).

La valeur du paramètre V_M^{ATP} de la fructokinase de *Fusobacterium mortiferum* est de 100 nmol/min/mg de protéine soit 100 fois plus important par rapport à la valeur mesurée chez *B. longum* A10C (Thompson *et al.*, 1992). Il apparaît ainsi que chez *B. longum* A10C la vitesse de la réaction de phosphorylation du fructose est relativement faible par rapport aux autres organismes analysés dans la littérature. Nous considérons toutefois que ces valeurs devront être analysées en parallèle avec les informations portant sur la spécificité de l'enzyme pour le substrat saccharidique.

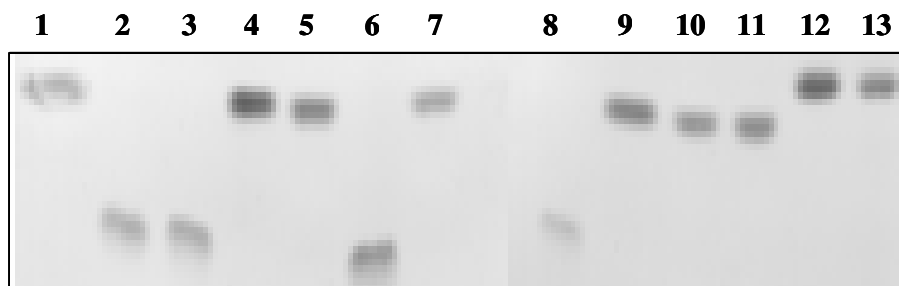


Figure RD 20. Analyse qualitative (par CCM) de la spécificité de substrat saccharidique de la protéine FrK.

Pistes: 1, 4, 7, 10, 12: témoins saccharidiques respectivement D-Fru, D-Glc, D-Man, L-Ara, Sac (5 µg);

Pistes: 2, 6, 8: témoins saccharidiques phosphorylés respectivement F6P, G6P, Man6P (5 µg);

Pistes: 3, 5, 9, 11, 13: produits obtenus après action de la protéine FrK (0,01 U) sur les saccharides (D-Fru, D-Glc, D-Man, L-Ara, Sac, respectivement) à une concentration de 1g/L.

III. 5. 9. Spécificité de substrat

III. 5. 9. 1. Spécificité de la fructokinase pour le substrat saccharidique (accepteur)

i) analyse par chromatographie en couche mince (CCM)

Par conséquent, la capacité de la fructokinase FrK purifiée à phosphoryler un ou plusieurs substrats saccharidiques a été analysée par chromatographie en couche mince et par HPAEC-PAD. Une étude bibliographique montre que chez *E. coli* (Sebastian et Asensio, 1972), *Zymomonas mobilis* (Weiser *et al.*, 1996), *Fusobacterium mortiferum* (Robrish *et al.*, 1991) *Leuconostoc mesenteroides* (Anderson et Sapico, 1975), *Lactococcus lactis* (Thompson *et al.*, 1991), *Streptococcus mutans* (Porter *et al.*, 1980) et *Solanum tuberosum* (Gardner *et al.*, 1992) la fructokinase présente également une activité mannokinase.

Nous nous sommes intéressés, dans un premiers temps, à la capacité de la fructokinase de *Bifidobacterium longum* A10C à phosphoryler le fructose et le mannose. L'analyse des produits issus de l'incubation du mannose en présence de la fructokinase par chromatographie en couche mince ne permet la détection d'aucun monosaccharide phosphorylé (Figure RD 20, piste 9, page 145). Par contre, dans les mêmes conditions, le fructose permet l'obtention du fructose-6-phosphate (Figure RD 20, piste 3, page 145). En effet, après 15 minutes d'incubation, la seule bande détectable sur la piste 3 correspond au fructose-6-phosphate.

Solanum tuberosum possède une isoenzyme II de la fructokinase capable de phosphoryler le glucose (Renz *et al.*, 1993). Nous avons donc examiné, dans un deuxième temps, la présence d'une éventuelle activité hexokinase chez la fructokinase de *Bifidobacterium longum*. De même, aucune trace de glucose phosphorylé n'a pu être détectée par aucune des techniques d'analyse utilisées (Figure RD 20, piste 5, page 145).

Trois autres monosaccharides (le D-xylose, le L-arabinose et le mannitol) et un disaccharide (le saccharose), susceptibles d'être phosphorylés par une hexose kinase ont été analysés (Figure RD 20, page 145). Dans tous les cas, on notera l'absence de saccharide phosphorylé.

ii) analyse par HPAEC-PAD

Tous les substrats glucidiques ont été également analysés par HPAEC-PAD, par élution isocratique des produits d'incubation (Figure RD 21, page 147). L'apparition d'un seul pic migrant comme le F6P a été observée dans le cas du fructose ($t_R = 2,33$) (Figure RD 21, chromatogramme 6, page 147). Dans toutes les autres situations, le profil chromatographique obtenu était caractérisé par la présence d'un seul pic correspondant au substrat glucidique testé (Figure RD 21, chromatogrammes de 1 à 5, page 147).

Pour confirmer ces résultats, une élution des produits d'incubation a également été effectuée en gradient d'acétate. Trois substrats saccharidiques ont été ainsi testés : le D-fructose, le D-mannose et le D-glucose. Pour chaque monosaccharide, deux temps d'incubation (une heure et quatre heures) ont été utilisés, de manière à pouvoir détecter une

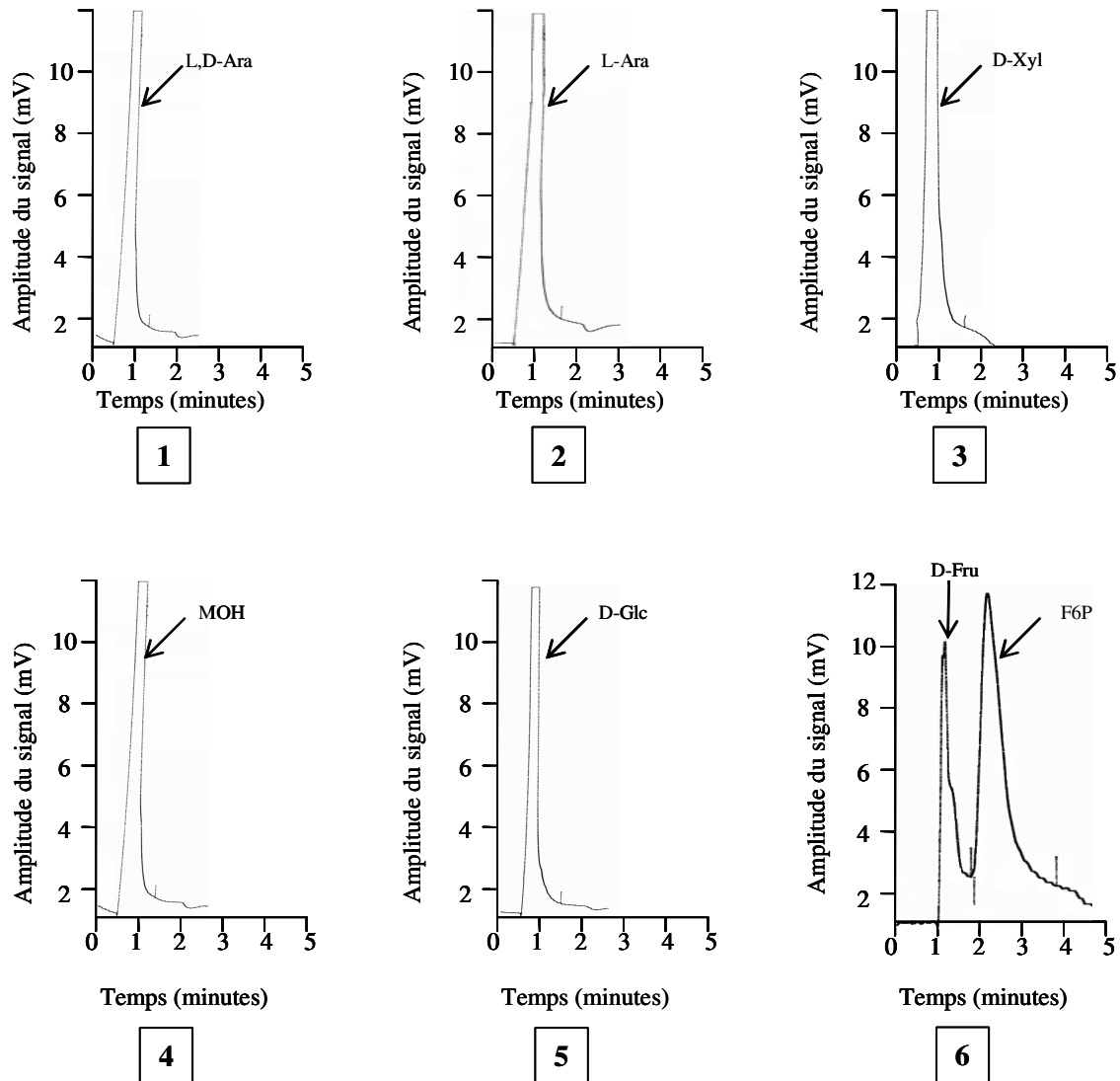


Figure RD 21. Analyse de la spécificité de substrat saccharidique de la fructokinase de *B. longum* A10C. Les produits obtenus après incubation de l'enzyme (0,01U) pendant 10 minutes à 37°C avec différents substrats glucidiques (2,7 mM) dans du tampon phosphate (0,1 mM, pH 6), en présence d'ATP (10 mM) et du $MgCl_2$ (10 mM) ont été analysés par HPAEC-PAD. Les saccharides analysés sont: (1) le L-arabinose (noté L-Ara); (2) un mélange de D,L-arabinose (noté D,L-Ara); (3), le D-xylose (noté D-Xyl); (4) le mannitol (noté D-MOH); (5) le D-glucose (noté D-Glc); (6) le D-fructose (noté D-Fru). Les pics correspondant à ces molécules, ainsi que le pic de fructose-6-phosphate (noté F6P) sont indiqués par une flèche.

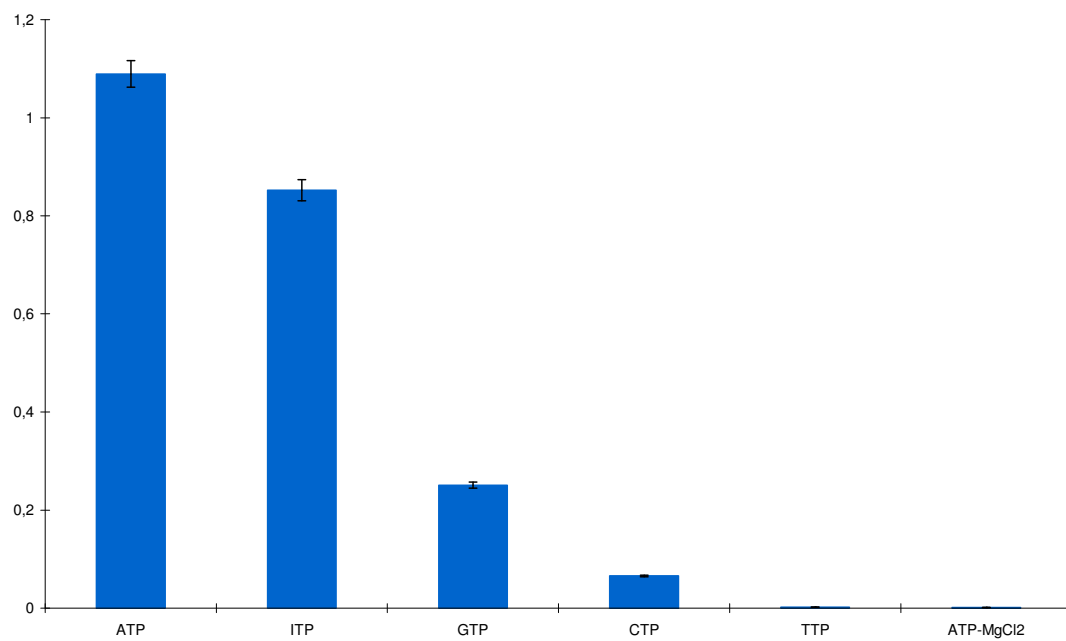


Figure RD 22. Variation de l'activité fructokinase en fonction du substrat nucléotidique.

éventuelle activité secondaire (mannokinase ou glucokinase) de la protéine FrK. Le seul pic détecté correspondant au monosaccharide phosphorylé est celui de F6P ($t_R = 6,52$).

A partir de ces résultats nous avons conclu que les deux techniques d'analyse utilisées permettent la mise en évidence d'un seul et unique substrat saccharidique pour la fructokinase de *B. longum* A10C, le D-fructose. Chez les bactéries, seule la fructokinase purifiée par Sabater et collaborateurs (1972) à partir de l'extrait cellulaire de *Streptomyces violaceoruber* présente une très haute spécificité pour le substrat saccharidique (le fructose). Chez les plantes (*Arabidopsis thaliana* et *Lycopersicon esculentum*), la fructokinase purifiée par surexpression d'un gène *frK* est également très spécifique du fructose (Gonzali *et al.*, 2001 ; Martines-Baranja *et al.*, 1997). Par conséquent, la protéine FrK de *B. longum* A10C constituerait un quatrième exemple d'une fructokinase phosphorylant spécifiquement le fructose.

III. 5. 9. 2. Spécificité de la fructokinase pour le substrat donneur (le nucléotide triphosphate)

Cinq nucléosides-triphosphates ont été testé du point de vue de leur capacité à fonctionner comme substrats donneurs de résidu phosphorylé pour la fructokinase. Nous avons supposé que dans tous les cas le cofacteur nécessaire pour la mise en conformation du donneur phosphorylé reste l'ion Mg^{2+} et nous avons dosé la quantité de fructose-6-phosphate produit dans ces conditions.

Les nucléosides-triphosphates dérivés de la purine peuvent agir comme substrats donneurs pour la fructokinase de *B. longum*. L'activité est maximale en présence d'ATP (1,08 unités d'absorbance) et diminue de 30% si le donneur est l'ITP (0,85 unités d'absorbance) (Figure RD 22, page 148). Le GTP peut lui aussi fonctionner comme donneur de résidu phosphorylé, mais l'efficacité du transfert est moindre (25% par rapport à l'ATP). Ce résultat suggère que la nature et la position des résidus greffés sur le noyau purique influencent l'interaction fonctionnelle enzyme / substrat nucléotidique.

Par contre, lors de l'utilisation des dérivés de la pyrimidine (CTP, TTP), la quantité de fructose-6-phosphate détectée est beaucoup moins importante, voir nulle (Figure RD 22, page 148). Lorsque le CTP est utilisé comme donneur de résidu phosphorylé, l'absorbance mesurée est de 0,065 unités d'absorbance, soit 6% d'activité enzymatique par rapport à l'ATP. Une très faible activité phosphotransférase est constatée lorsque le TTP est utilisé comme substrat nucléotidique (<0,2% de l'activité enzymatique mesurée par rapport à l'ATP) (Figure RD 22, page 148). Ce qui s'explique soit par une moindre affinité de la fructokinase pour ces deux nucléotides, soit par une capacité de déphosphorylation réduite (due, par exemple, à la nature du cofacteur utilisé).

L'affinité pour différents substrats nucléotidiques a été analysée pour deux fructokinases isolées à partir de deux organismes à paroi Gram positif, *Streptomyces violaceoruber* et *Lactococcus lactis* (Tableau G11, page 69). Pour les deux enzymes, l'activité phosphotransférase est maximale en présence de l'ATP (100% d'activité relative) (Sabater *et al.*, 1972, Thompson *et al.*, 1991). Cette activité reste importante (supérieure à 43% par rapport à l'ATP) pour deux autres donneurs de résidus phosphorylé, l'ITP et le GTP. Par exemple, chez *Streptomyces violaceoruber* (bactérie à Gram positif à haut pourcentage en GC), la réactivité de la fructokinase envers l'ITP et le GTP représente 60% et 50% respectivement, par rapport à la valeur déterminée en présence de l'ATP (Sabater *et al.*, 1972). Chez *Lactococcus lactis*, la réactivité de la fructokinase pour l'ITP et le GTP n'est que de 43% et 44% respectivement, par rapport à la valeur mesurée en présence d'ATP (Thompson *et al.*, 1991). L'affinité de ces deux fructokinases pour les substrats

Tableau RD 5. Caractéristiques structurales de différentes fructokinases.

	<i>Bifidobacterium longum</i> A10C * (1)	<i>Lactococcus lactis cremonis</i> (1)	<i>Streptococcus mutans</i> (1)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> * (1)	<i>Salmonella typhimurium</i> * (1)	<i>Solanum tuberosum</i> *(1)	<i>Vibrio alginolyticus</i> *(1)
No.résidus	298	289	293	300	307	319	307
MW (KDa)	32.5	31.5	31.7	31.5	33	33.7	33
pI	4.97	7.29	5.76	5.25	5.16	5.86	4.87
IP (%)	43.29	41.18	40.6	37.33	41.04	40.04	43.65

Sur les 7 fructokinases analysées, 5 enzymes sont membres de la famille PfkBI (*). Le nombre de résidus d'acides aminés (noté No.résidus), la masse moléculaire (notée MW), le point isoélectrique théorique (noté pI) et l'indice de polarité (noté IP et représentant le pourcentage de résidus d'acides aminés hydrophyles) sont indiqués.

(1) Ces informations ont été obtenues à partir des séquences nucléotidiques et protéiques existant dans les banques de données (www.ncbi.com) et analysées utilisant les services de bioinformatiques fournis par le site www.infobiogen.fr.

nucléotidiques dérivés de la purine (le CTP, le TTP et l'UTP) est faible (inférieure à 30% par rapport à l'ATP) (Tableau G 11, page 69).

III. 5. 10. Conclusion

La fructokinase FrK de *B. longum* A10C est une protéine composée de 298 résidus d'acides aminés, de masse moléculaire d'environ 33 KDa (gel SDS-PAGE) et présentant un point isoélectrique théorique de 4,97 (valeur calculée à l'aide du logiciel du site www.infobiogen.fr). Du point de vue de la structure primaire, cette protéine appartient à la famille des phosphofructokinases (famille PfKB). Les propriétés structurales déduites à partir de la séquence en acides aminés de la protéine FrK ont été analysées par rapport aux autres fructokinases bactériennes (Tableau RD 5, page 150). On peut ainsi observer que toutes les 7 fructokinases étudiées sont des protéines d'environ 300 résidus d'acides aminés ($\pm 7\%$) et de poids moléculaire variant de 32 à 34 kDa. Dans tous les cas, l'indice de polarité (IP), défini comme pourcentage d'acides aminés hydrophiles est d'environ 40%, suggérant une localisation cytosolique de la protéine. Le point isoélectrique calculé est placé dans le domaine acide de pH, sauf pour la fructokinase de *Lactococcus lactis cremonis* où il atteint la valeur de 7,29.

Les optima d'activité (température et pH) de la protéine FrK sont atteints pour des valeurs que l'on peut considérer comme atypiques pour une fructokinase bactérienne (50°C, pH 6). De même, en se référant aux informations bibliographiques, l'affinité de la fructokinase de *B. longum* A10C pour ces deux substrats (le fructose et l'ATP) est relativement faible. En effet, la valeur de la constante de Michaelis pour le fructose ($K_M^{\text{Fru}}=0,7$ mM) est la plus grande des valeurs mesurées pour les fructokinases caractérisées chez les bactéries à Gram positif. Cette valeur est comparable avec celle déterminée pour la fructokinase de *Zymomonas mobilis*. Toutefois, la protéine FrK de *Zymomonas mobilis* est une mannofructokinase ($K_M^{\text{Man}}=0,65$ mM) (Weisser *et al.*, 1996).

Lors de l'analyse des valeurs des paramètres cinétiques K_M et V_M , des résultats similaires ont été obtenus pour les deux substrats analysés ($K_M \approx 0,7$ mM et $V_M \approx 1$ nmol/min/mg de protéine). Cela suggère que la fructokinase de *B. longum* A10C présente une même affinité pour le fructose et l'ATP. La réaction de phosphorylation du fructose par l'ATP aurait donc lieu selon un mécanisme de type Bi-Bi aléatoire.

Nous considérons que la très haute spécificité de la fructokinase de *B. longum* A10C envers le fructose représente la caractéristique la plus intéressante de cette protéine. En effet, une seule autre fructokinase bactérienne, purifiée à partir des cellules de *Streptomyces violaceoruber*, phosphoryle spécifiquement ce monosaccharide (Sabater *et al.*, 1972). Toutefois, la séquence en acides aminés de la fructokinase de *Streptomyces* sp. n'a pas encore été déterminée. Une étude de la séquence chromosomique de *S. coelicolor* A3(2) publiée sur réseau informatique (www.ncbi.nlm.nih.gov, AL939110) nous a permis d'identifier, chez cette espèce, un seul gène codant pour une fructokinase putative (SCO1957, ID 1097391). Ce cadre de lecture code pour une protéine de 302 acides aminés de la famille PfKB. Cette fructokinase putative présente 41% d'identité avec la protéine FrK de *Rhizobium leguminosarum* (NP_626221) et 29% d'identité avec la protéine FrK de *B. longum* A10C. Un régulateur transcriptionnel de la famille LacI (gène SCO1956) a pu également être identifié par analyse bioinformatique, 1 kb en amont du gène codant pour cette fructokinase putative. Il apparaît donc que chez *Streptomyces* sp., comme chez

Tableau RD 6. Kinases spécifiques des monosaccharides identifiées par analyse bioinformatique de la séquence chromosomique de deux souches de *B. longum*.

Enzyme	Gène identifié sur la séquence du chromosome de <i>B. longum</i> NCC2705	Gène identifié sur la séquence du chromosome de <i>B. longum</i> DJ010A
Fructokinase (EC 2.7.1.4)	BL1339*	1744*
Glucokinase (EC 2.7.1.2)	BL 0047** BL 1341** BL 1691	922** 1834** -
Galactokinase (EC 2.7.1.6)	BL 1210	1233
Ribokinase (EC 2.7.1.15)	BL 1431	313
Xylulose kinase (EC 2.7.1.17)	BL 1293 BL 1709	- 1784
Autres kinases spécifiques des saccharides	BL 0331* BL 1772*	- -

* Gènes codant pour des protéines présentant les motifs spécifiques de la famille PFKB des kinases spécifiques des monosaccharides.

** Gènes codant pour des protéines présentant le motif spécifique de la famille ROK (Repressors, Open Reading Frames, Kinases).

Bifidobacterium sp., le gène codant pour une fructokinase n'est pas inclus dans une structure de type opéron (par exemple opéron saccharose).

L'absence d'activité mannokinase dans le cas de la protéine FrK de *B. longum* A10C, corrélée avec la capacité de cette espèce à croître en présence de mannose comme seule source de carbone (F. Gavini, communication personnelle) nous laisse penser que *B. longum* posséderait également une enzyme à activité mannose kinase. De plus, une analyse bioinformatique de la séquence annotée du chromosome de *B. longum* NCC2705 nous a permis de constater la présence de 10 cadres de lecture codant pour des kinases putatives impliquées dans la phosphorylation des saccharides (Tableau RD 6, page 152).

Ces observations, reliées avec la présence d'un seul système de type PEP :PTS et avec la détection par voie bioinformatique des systèmes de type ABC impliqués dans le transport des oligosaccharides (OS) (Schell *et al.*, 2002) renforcent notre hypothèse concernant le métabolisme des OS chez *Bifidobacterium longum*. Par conséquent, la dégradation des OS chez cette espèce bactérienne se réaliserait selon le modèle métabolique suivant :

1) Dans un premier temps, les bifidobactéries transporteraient à travers la paroi cellulaire des structures oligosaccharidiques à faible degré de polymérisation ($DP < 5$). Cette supposition est soutenue par l'identification (par analyse bioinformatique de la séquence chromosomique de *B. longum* NCC2705) de deux cadres de lectures (BL 0143 et BL 0144) qui coderaient pour deux perméases spécifiques des OS. Ces perméases présenteraient une séquence en acides aminés caractéristiques pour les membres de la famille des transporteurs de type ABC.

2) Ces structures saccharidiques seraient hydrolysées dans la cellule bactérienne par des hydrolases spécifiques cytosoliques.

3) Les monosaccharides ainsi obtenus seraient ensuite phosphorylés par les kinases caractéristiques des saccharides (EC 2.7.1.X), conduisant aux formes mobiles, métabolisables de ces substrats.

Chapitre IV. Etude de l'expression du gène *frK* de *B. longum* A10C en fonction de la source de carbone présente dans le milieu de culture

IV. 1. Généralités

Dans le but d'analyser l'influence du substrat saccharidique (le fructose) sur le taux d'expression du gène *frK*, la souche *B. longum* A10C a été cultivée pendant 16 heures en milieu de Garches contenant une seule source de carbone : du fructose (2g/L), du glucose (2g/L), ou un mélange équimoléculaire de ces deux saccharides (2g/L).

Pour quantifier le taux d'expression du gène *frK*, donc la synthèse de la protéine FrK, l'activité fructokinase de l'extrait cellulaire de la souche *B. longum* A10C cultivée comme décrit précédemment a été mesurée par HPAEC-PAD et exprimée en pmoles d'hexoses phosphorylés (glucose-6-phosphate +fructose-6-phosphate)/ μ g de protéine soluble/min. Dans un premier temps, des témoins de fructose (F), glucose (G), glucose-1-phosphate (G1P), glucose-6-phosphate (G6P), fructose-1-phosphate (F1P), fructose-6-phosphate (F6P), fructose-1,6-diphosphate (F1,6P) et sédoheptulose-7-phosphate (S7P) ont permis l'identification des deux saccharides phosphorylés formés comme étant le G6P ($t_R=17,89$) et le F6P ($t_R=19,18$) (Figure RD 23, page 155).

Puis, pour des analyses quantitatives, une gamme étalon de solutions de G6P et de F6P (5 à 50 μ g monosaccharide/injection) a été réalisée. Il a été constaté que, dans les conditions d'éluion utilisées, 1 μ g de G6P correspond à 14300 unités de surface (US). De même manière, il a été remarqué que 1 μ g de F6P fourni un pic de 7125 unités de surface (US).

Lors de l'incubation des extraits enzymatiques de *B. longum* A10C avec le fructose, des essais avec des quantités différentes de protéines (de 1,25 à 10 μ g/essai) ont été effectués. Par conséquent, la surface mesurée pour chaque pic a été rapportée à la surface des pics témoins et à la quantité d'extrait enzymatique utilisé.

L'activité ATP:D-fructose 6-phosphotransferase ainsi déterminée, illustre la quantité de fructokinase synthétisée par la cellule dans les conditions utilisées, donc le taux d'expression du gène *frK*. La souche *B. longum* DSM20219 (Fru⁻) a été utilisée comme témoin négatif.

IV. 2. Analyse de l'activité fructokinase des cellules cultivées en présence de glucose comme seule source de carbone

La surface moyenne des pics correspondant au glucose-6-phosphate formé à partir du fructose est d'environ 12441 US/ μ g de protéine (Tableau RT7, page 156). Cela correspond à une quantité de glucose-6-phosphate d'approximativement 191 pmoles formés par minute et par μ g de protéine soluble présentes dans l'extrait de *B. longum* A10C. La surface des pics correspondant au fructose-6-phosphate a une valeur moyenne de 2166 US/ μ g protéine. Cette valeur indique la formation d'approximativement 65 nmoles de F6P/min/ μ g à partir du glucose-6-phosphate. Ces valeurs ont permis de calculer une activité fructokinase de 256 nmoles d'hexoses phosphorylés/min/ μ g de protéine.

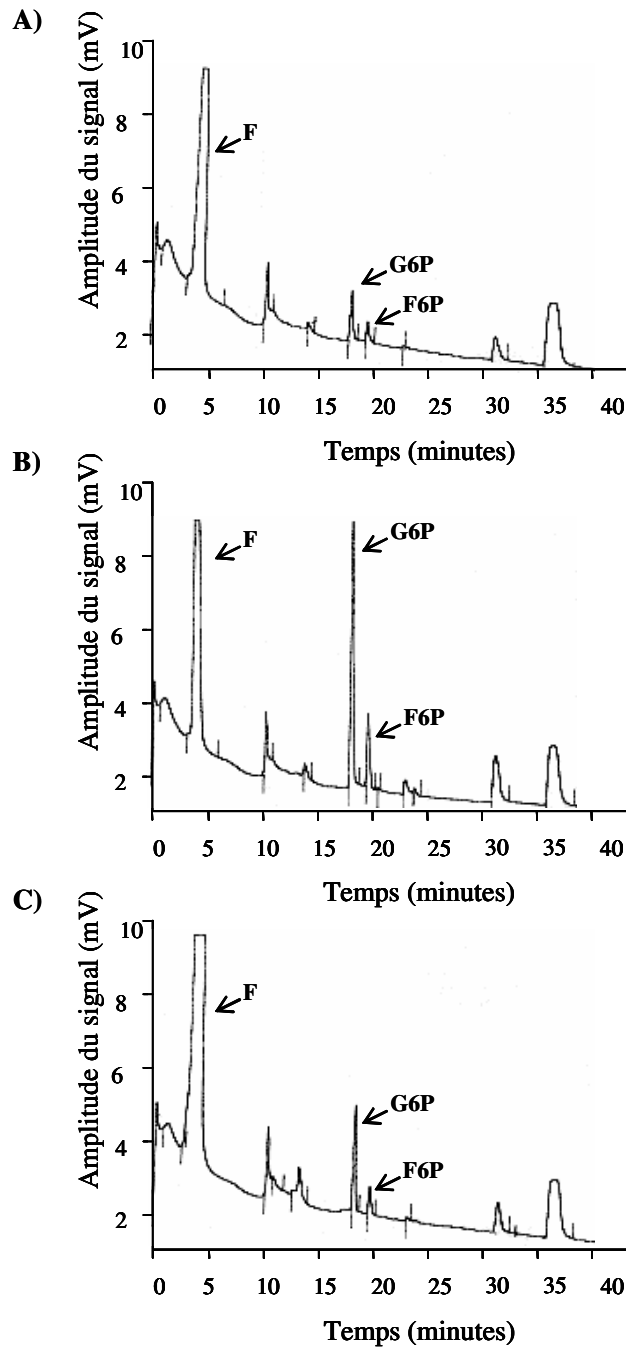


Figure RD 23. Analyse de l'influence de la source de carbone sur l'expression du gène *frK*. Les cellules de *B. longum* A10C ont été cultivées pendant 16h en milieu de Garches contenant un seul type de source de carbone. **A)** Glucose (2g/L). **B)** Fructose (2g/L). **C)** un mélange équimoléculaire de fructose (2g/L) et glucose (2g/L). Les produits d'incubation du fructose (1g/L) avec l'extrait cellulaire de *B. longum* A10C ont été analysés par HPAEC-PAD. Les pics correspondant au fructose (F), glucose-6-phosphate (G6P) et au fructose-6-phosphate sont indiqués par une flèche.

Tableau RD 7. Etude de la régulation de l'expression du gène *frK*.

Substrat saccharidique de croissance	essai	S _{G6P} (US)	S' _{G6P} (US/μg)	Q _{G6P} (pmoles/μg/min)	S _{F6P} (US)	S' _{F6P} (US/μg)	Q _{F6P} (pmoles/μg/min)	Q _{G6P+F6P} (pmoles/μg/min)	Moyenne	Ecart type	FI
Glucose	1	64071	12814,2	196	11499	2299,8	68,9	265,5	255,4	26,8	1
	2	64259	12851,8	197	11471	2294,2	68,8	265,9			
	3	64120	12824	196	11398	2279,6	68,4	264,6			
	4	112643	11264,3	172	22028	2202,8	66,08	238,4			
	5	145075	14507,5	221,9	24208	2420,8	72,6	294,6			
	6	143061	14306,1	218,9	23581	2358,1	70,7	289,6			
	7	13828	11062,4	169,2	2265	1812	54,4	223,6			
	8	14021	11216,8	171,6	2352	1881,6	56,4	228,05			
	9	13911	11128,8	170,2	2431	1944,8	58,3	228,6			
Fructose	1	104390	83512	1277,7	31149	24919,2	747,5	2025,3	1797,8	162,7	7
	2	81878	65502,4	1002,2	25175	20140	604,2	1606,4			
	3	90955	72764	1113,3	26723	21378,4	641,4	1754,6			
	4	74845	59876	919,1	24420	19536	586,1	1505,2			
	5	107739	86191,2	1318,7	23506	18804,8	564,1	1882,8			
	6	97748	78198,4	1196,4	27710	22168	665,1	1861,5			
	7	93920	75136	1149,6	26980	21584	647,5	1797,1			
	8	95820	76656	1172,8	25821	20656,8	619,7	1792,5			
	9	103210	82568	1263,3	28810	23048	691,4	1954,7			
Glucose +Fructose	1	183747	73498,8	1124,5	39967	15986,8	479,6	1604,1	1193,724	109,7435	4,6
	2	172392	68956,8	1055,1	30971	12388,4	371,6	1426,7			
	3	123058	49223,2	753,1	30821	12328,4	369,8	1122,9			
	4	120111	48044,4	735,1	28235	11294	338,8	1073,9			
	5	135040	54016	826,4	27910	11164	334,9	1161,3			
	6	140181	56072,4	857,9	28311	11324,4	339,7	1197,6			
	7	139210	55684	851,9	27231	10892,4	326,7	1178,7			
	8	145102	58040,8	888,1	28121	11248,4	337,4	1225,			
	9	125892	50356,8	770,4	27421	10968,4	329,1	1099,5			

Les cellules de *B. longum* A10C ont été cultivées pendant 16 heures en milieu de Garches renfermant une seule source de carbone : glucose (2g/L), fructose (2g/L), ou un mélange équimoléculaire des deux hexoses (2g/L). L'activité fructokinase des extraits enzymatiques a été analysée par HPAEC-PAD. La surface des pics correspondant au glucose-6-phosphate (S_{G6P}) et au fructose-6-phosphate (S_{F6P}) a été mesurée et exprimée en unités de surface (US). Ces valeurs ont été corrélées avec la quantité de protéines solubles utilisées. Les valeurs ainsi obtenues (S'_{G6P} et S'_{F6P}) ont permis de calculer la quantité (en pmoles) de chaque monosaccharide formé (Q_{G6P}, Q_{F6P}) et d'exprimer l'activité enzymatique en pmoles d'hexoses phosphorylés/min/μg de protéine. Les valeurs indiquées représentent la moyenne de trois déterminations différentes. Pour chaque série de données, la moyenne, l'écart type et le facteur d'induction (FI) ont été calculés.

IV. 3. Analyse de l'activité fructokinase des cellules cultivées en présence de fructose comme seule source de carbone

Les valeurs obtenues pour les surfaces des pics correspondant au G6P et au F6P sont d'approximativement 75600 et 21026 US/ μ g de protéine, respectivement (Tableau RD7, page 156). Les quantités de G6P et F6P estimées à partir de ces données sont de 1160 et 645 pmoles de saccharide phosphorylé/min/ μ g, respectivement. L'activité fructokinase des cellules de *B. longum* A10C, calculée à partir de ces valeurs, est d'approximativement 1800 nmoles/min/ μ g de protéine (Tableau RD7, page 156). Cette valeur est 7 fois plus importante par rapport à l'activité fructokinase mesurée à partir des cellules cultivées en présence de glucose.

IV. 4. Analyse de l'activité fructokinase des cellules cultivées en présence d'une source de carbone constituée d'un mélange équimoléculaire de glucose et fructose

L'analyse quantitative du profil de phosphorylation du fructose par l'extrait cellulaire de *B. longum* A10C révèle, du point de vue de l'activité fructokinase, des valeurs intermédiaires par rapport aux cultures réalisées avec un seul type de monosaccharide (Tableau RD7, page 156). En effet, la surface moyenne des pics de G6P est de 51790 US/ μ g, ce qui correspond à une quantité de G6P d'approximativement 820 pmoles/ μ g/min. La surface des pics de F6P formé à partir de G6P a une valeur moyenne de 11955 US/ μ g. La quantité de F6P mesurée lors de cet essai est donc de 370 pmoles/ μ g/min. A partir de ces valeurs, nous avons pu calculer une activité fructokinase d'environ 1200 pmoles/ μ g/min. Cette activité est 4,6 fois supérieure à l'activité mesurée utilisant les cellules cultivées en présence de glucose.

IV. 5. Discussions

IV. 5. 1. Induction de l'expression du gène *frK* par le D-fructose

Dans notre étude, nous n'avons pas réalisé un dosage du taux d'expression du gène *frK per se*, mais nous avons analysé l'activité fructokinase de l'extrait cellulaire de *B. longum* A10C. Nous avons considéré que, dans les conditions de culture employées, le taux d'expression du gène *frK* est proportionnel avec le taux de biosynthèse de la protéine FrK, donc avec l'activité fructokinase de l'extrait enzymatique total obtenu après lyse des cellules bactériennes. En effet, il est admis que, chez les bactéries, les processus de transcription et de traduction se produisent quasi simultanément.

Les cultures bactériennes ont été conduites pendant une durée suffisamment longue (16 heures, fin de la phase exponentielle de croissance), de manière à éliminer le temps d'induction de l'expression des enzymes nécessaires au métabolisme des monosaccharides. En effet, au bout de 16 heures de culture, le taux des monosaccharides dosés dans le milieu de culture est nul. La méthode de dosage de l'activité fructokinase, basée sur une technique chromatographique très sensible (HPAEC-PAD) nous a permis d'estimer la quantité de produit phosphorylé formé (F6P) utilisant l'extrait cellulaire complet de *B. longum* A10C. En effet, en présence du fructose, les enzymes présentes dans cet extrait cellulaire produisent du

F6P, mais également du G6P, du S7P ainsi que d'autres produits (intermédiaires ou finaux) de la voie de la F6PPK. Des expériences préliminaires effectuées au laboratoire nous ont permis d'observer que le F6P ainsi formé est d'abord transformé, par une glucose-6-phosphate isomérase (PGI, EC 5. 3. 1. 9) en G6P. Puis, en fonction des nécessités métaboliques de la cellule, le G6P est reconverti en F6P qui peut intégrer, généralement, deux types de voies métaboliques :

- biosynthèse du peptidoglycane (*via* l'UDP-GlcNAc);
- production de l'ATP, du lactate et de l'acétate (comme substrat de la F6PPK).

En utilisant des temps d'incubation courts et une quantité de substrat (D-fructose) importante (1 µg fructose/µL de volume réactionnel), nous avons estimé que l'activité fructokinase serait proportionnelle avec la quantité de ces deux monosaccharides phosphorylés formés (F6P+G6P). La valeur ainsi obtenue a été rapportée à la quantité de protéine FrK utilisée et au temps d'incubation et nous a permis de calculer une activité fructokinase pour chacun des trois types d'extrait enzymatiques analysés.

En exploitant cette approche, nous avons observé que l'activité fructokinase mesurée à partir de cellules cultivées en milieu Garches-fructose est sept fois plus importante par rapport aux cultures effectuées en milieu Garches-glucose. Ce résultat est à corrélérer avec deux observations réalisées à partir de la séquence chromosomique de *B. longum* NCC2705 :

- les bifidobactéries utiliseraient prépondérément la régulation négative de l'expression génétique (Schell *et al.*, 2002).
- la présence d'un répresseur transcriptionnel putatif de type ROK en amont du gène *frK* (Figure RD 5, page 119).

Ces informations suggèrent qu'en présence de fructose il y aurait levée de la répression de l'expression du gène *frK*.

Ce résultat est confirmé par d'autres études similaires réalisées chez les bifidobactéries. En effet, deux études portant sur l'influence de la source de carbone sur le taux de transcription des gènes impliqués dans le métabolisme glucidique de *Bifidobacterium* sp. sont citées dans la littérature. Par exemple, l'influence de quatre différents saccharides (D-glucose, D-fructose, saccharose et oligofructose -Actilight®) sur le taux de biosynthèse d'une β-fructofuranosidase de *B. longum* biovar. *infantis* a été analysée par Perrin et ses collègues (2001). Pour ce faire, les cellules bactériennes de *B. longum* biovar. *infantis* ont été cultivées dans un milieu semisynthétique contenant une des ces quatre saccharides. Les taux de croissance bactérienne, d'utilisation des saccharides, et de synthèse des produits finaux du métabolisme glucidique (lactate et acétate) ont été déterminés. Ces valeurs ont été corrélées avec l'activité β-fructofuranosidase mesurée à partir de l'extrait cellulaire de *B. longum* biovar. *infantis*. Les résultats indiquent une forte induction de la biosynthèse de cette protéine lorsque les cellules sont cultivées en présence de fructose comme seule source de carbone (10 fois plus d'activité β-fructofuranosidase par rapport aux cellules cultivées sur glucose) (Perrin *et al.*, 2001). De même, Trindade et collaborateurs (2003) ont mesuré, par RT-PCR, le taux d'expression du gène codant pour une saccharose phosphorylase de *B. lactis* en utilisant des cellules bactériennes cultivées en milieu semi synthétique contenant une seule source de carbone (du glucose, du saccharose ou un mélange équimoléculaire des deux saccharides). L'expression du gène analysé s'est révélé six fois plus important dans les cellules cultivées en

présence de saccharose par rapport aux cellules utilisant le glucose comme seule source de carbone (Trindade *et al.*, 2003).

IV. 5. 2. Répression de l'expression du gène *frK* par le D-glucose

Lorsque les cellules de *B. longum* A10C sont cultivées en présence d'un mélange équimoléculaire de fructose et de glucose, l'activité fructokinase mesurée est seulement 4,5 fois plus importante par rapport aux cellules cultivées en milieu Garches-glucose. Ce résultat suggère la présence chez *B. longum* d'un phénomène de répression (catabolique) exercé par le glucose.

Chez les bifidobactéries, ce phénomène a été observé pour la première fois par Perrin et collaborateurs (2001), lors de l'étude des facteurs modulant la biosynthèse d'une β -fructofuranosidase de *B. infantis* biovar. *longum*. Il a été ainsi observé que lors de la croissance de cette espèce en présence de différents FOS (GF2, GF3, GF4), des molécules de fructose et de saccharose, mais pas de glucose, sont éliminées dans le milieu de culture (Perrin *et al.*, 2001). Même si ces auteurs ne donnent aucune interprétation à ce processus, nous considérons qu'il s'agit d'un phénomène d'expulsion de l'inducteur (le fructose) exercé par une autre molécule (le glucose) responsable de la répression de l'utilisation de cet inducteur (une synthèse des informations portant sur la répression catabolique chez les bactéries a été réalisée dans le Chapitre Généralités (§ I. 7. 4., pages 54 à 60).

Plus tard, en 2003, Trindade et collaborateurs observent également, chez *B. lactis*, une répression de l'expression du gène codant pour une saccharose phosphorylase par le glucose. En effet, comme décrit précédemment (§ IV. 5. 1), ces auteurs ont cultivé les cellules bactériennes en milieu contenant une seule source de carbone (du saccharose, du glucose ou des quantités équivalentes de saccharose et glucose). Le taux d'ARN_m transcrit à partir de ce gène a été mesuré pour chacun de ces quatre types de cultures. Il a été ainsi observé que, par rapport aux cellules cultivées en présence de glucose, le taux de transcription du gène est seulement quatre fois plus important dans les cultures effectuées en milieu renfermant les deux saccharides. Ces auteurs concluent que, chez *B. lactis*, l'utilisation du saccharose et l'expression du gène responsable de la phosphorylation de ce disaccharide sont soumises à la répression catabolique exercée par le glucose (Trindade *et al.*, 2003). Dans le but d'expliquer ce phénomène, ces auteurs analysent la séquence nucléotidique située en amont de l'opéron saccharose (qui inclut le gène codant pour la saccharose phosphorylase) avec l'objectif de retrouver une séquence spécifique de fixation du régulateur pléiotropique CcpA (catabolite contrôle protéin). Toutefois, aucune séquence typique de ce type n'est retrouvée.

Chapitre V. Caractérisation du phénotype *Fru*⁻ de la souche

B. longum DSM20219

Comme décrit précédemment, la souche type *B. longum* DSM20219 est incapable de métaboliser le fructose. Deux hypothèses pourraient expliquer ce phénotype *Fru*⁻ :

- une déficience du transport du fructose,
- une déficience dans l'expression d'un ou plusieurs gènes, régulateurs ou codant pour des protéines responsables du métabolisme de ce monosaccharide

Par analyse chromatographique du profil de dégradation du fructose par l'extrait cellulaire de *B. longum* DSM20219, nous avons pu constater que cette souche doit son phénotype *Fru*⁻ à une absence d'activité fructokinase. Dans le but de caractériser cette souche mutante, une analyse génotypique du locus *frK* a été effectuée.

V. I. Transport transmembranaire du fructose

Dans le but de démontrer que le phénotype *Fru*⁻ de *B. longum* DSM20219 est uniquement lié à l'absence d'activité fructokinase, une analyse du transport du fructose chez cette souche a été réalisée. Ainsi, les cellules de *B. longum* A10C (contrôle positif) et DSM20219 ont été incubées à 37°C en présence de fructose radiomarqué (1 mg de fructose/mL correspondant à 1,46 mCi/mmol). Des échantillons ont été prélevés après 1, 2, 5 et 10 minutes et la quantité de fructose marqué a été mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation liquide. L'analyse du profil d'incorporation du fructose montre la présence de fructose radioactif intracellulaire dans le cas des deux souches analysées (Figure RD 24, page 161).

Pendant la première minute d'incubation, les deux souches incorporent le fructose, mais en quantités différentes. Le taux de fructose incorporé par la souche contrôle A10C (*Fru*⁺) est d'environ 45 nmoles de fructose/mg de protéines. Par rapport à cette souche, *B. longum* DSM20219 (*Fru*⁻) incorpore faiblement le fructose (7 nmoles de fructose incorporé /mg de protéines).

La quantité de fructose marqué mesuré à l'intérieur des cellules de *B. longum* A10C croît d'une façon linéaire pendant les 8 minutes suivant le début de l'incubation de 50 à 70 nmoles de fructose incorporé/mg de protéines (Figure RD 24, page 161).

Par contre après deux minutes d'incubation, la quantité de fructose mesurée dans les cellules de *B. longum* DSM20219 reste constante (environ 10 nmoles de fructose/mg de protéines) et ce jusqu'à la fin de l'expérience.

Ces résultats ont permis de démontrer que les molécules de fructose peuvent pénétrer à l'intérieur des cellules de *B. longum* DSM20219.

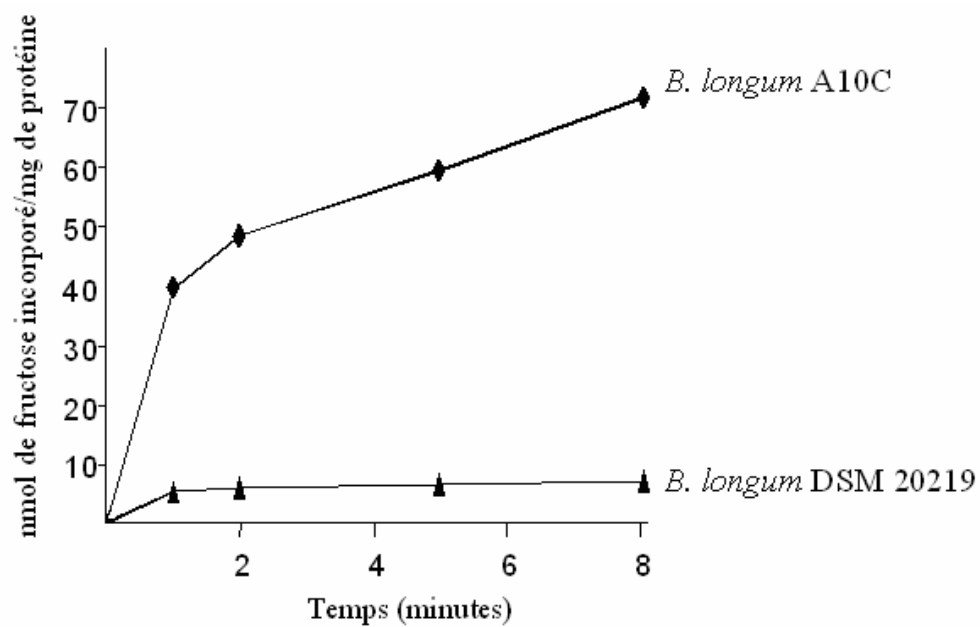


Figure RD 24. Incorporation du fructose par deux souches de *B. longum* (A10C et DSM20219). Le fructose radiomarqué utilisé a une activité de 1,46 mCi/mmol (D-[U-14C]).

V. 2. Etude du contexte génétique du locus *frK* chez *B. longum* DSM20219

Une analyse comparative d'une séquence nucléotidique d'environ 9,2 kb entourant le *frK* a été réalisée utilisant l'ADN_g des deux souches de *B. longum* : DSM20219 (*Fru*⁻) et A10C (*Fru*⁺). Deux types d'approches ont été employées :

- une approche utilisant la technique de la PCR
- une approche d'hybridation sur membrane ADN-ADN utilisant des sondes oligonucléotidiques spécifiques de la séquence de *B. longum* (NCC2705 et DJ010A).

V. 2. 1. Analyse par PCR du locus *frK*

V. 2. 1. 1. Absence de la séquence codante de la protéine FrK.

Trois couples d'amorces oligonucléotidiques (*frK*_{ATG}/*frK*_{TAA}, *frK*_{ATG}/*frK*_{DW}, *frK*_{Up}/*frK*_{TAA}), précédemment employés lors du clonage du gène *frK* (Tableau RD3, page 123), ont été utilisés dans une réaction d'amplification par PCR de l'ADN de *B. longum* DSM20219. La souche A10C a servi de contrôle positif. Les produits d'amplification ont été séparés sur un gel d'agarose (2%) et visualisés par coloration au bromure d'ethidium (BET).

Lorsque l'ADN_g de *B. longum* A10C a servi de matrice, ces trois couples d'amorces ont conduit aux produits d'amplification dont la taille correspond à la taille attendue des amplicons (553 pb, 894 pb, et 338 pb) (Figure RD 25, pistes 1, 2 et 3 respectivement, page 163). Par contre, lorsque l'expérience est réalisée en utilisant l'ADN_g de *B. longum* DSM20219 comme matrice, ces bandes ne sont plus détectées sur gel (Figure R21, pistes 6, 7,8, page 163). Seules deux bandes de faible intensité sont visibles après migration (Figure RD 25, piste 8, page 163). Après séquençage, ces deux fragments nucléotidiques se sont révélés comme étant de produits d'amplification non spécifique. Ces résultats laissent penser qu'une délétion du gène *frK* serait responsable du phénotype *Fru*⁻ de *B. longum* DSM20219.

V. 2. 1. 2. Analyse par PCR du contexte génétique du locus *frK*

Pour vérifier cette hypothèse, la région chromosomique de 9,2 kb incluant le locus *frK* a été analysée plus en détail. Pour ce faire, huit autres couples d'amorces oligonucléotidiques ont été définis en amont et en aval du locus *frK* (Tableau RD 3, page 123 et Figure RD 26, page 164). A l'aide de ces amorces, une étude comparative des produits d'amplification par PCR a été menée sur l'ADN_g des deux souches de *B. longum*, *Fru*⁺ (A10C) et *Fru*⁻ (DSM20219). Dans chaque cas, l'ADN_g de *B. longum* A10C a servi de contrôle positif. Lorsque la séparation des amplicons sur gel d'agarose a mis en évidence des produits d'amplifications non spécifique à forte concentration, une deuxième amplification par PCR en gradient de température (de 50 à 60 °C), suivie du séquençage de ces produits a été réalisée.

Le premier couple d'amorces oligonucléotidiques a été défini 1,9 kb en amont du gène *frK* et correspond au cadre de lecture du gène *glK* codant pour une glucokinase putative (Figure RD 27, page 165). L'amorce *glK*_{ATG} est située à une extrémité de ce cadre

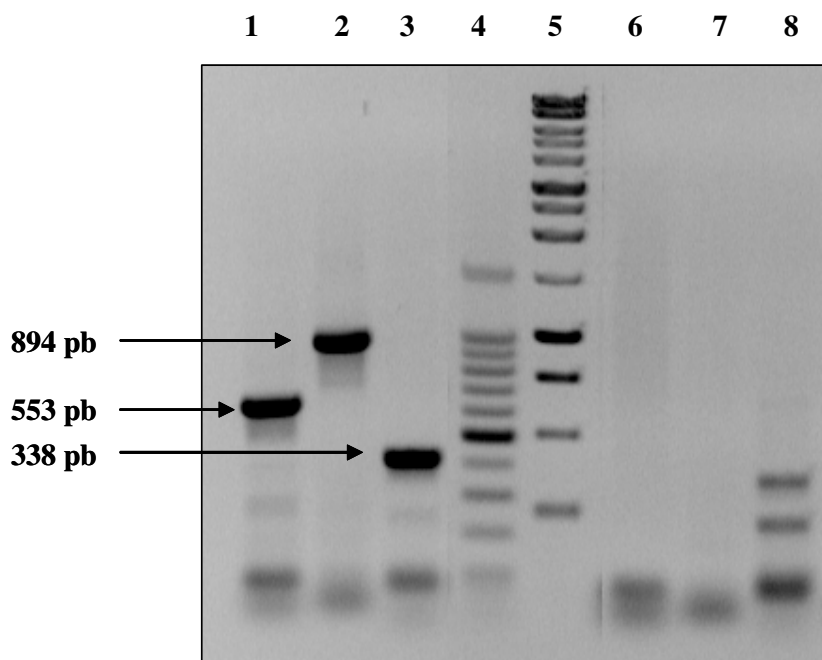


Figure RD 25. Profil de séparation électrophorétique des produits d'amplification par PCR de l'ADN_g de *B. longum* A10C (pistes de 1 à 3) et de *B. longum* DSM20219 (pistes de 6 à 8) par les couples d'amorces oligonucléotidiques suivants: frK_{ATG}/frK_{DW} (pistes 1 et 6), frK_{ATG}/frK_{TAA} (piste 2 et 7), frK_{UP}/frK_{TAA} (piste 3 et 8). Pistes 4 et 5, témoins de masse moléculaire (1 KB, Promega et X, Roche, respectivement). La séparation des bandes d'ADN a été réalisée sur gel d'agarose à 2%, dans du tampon TBE.

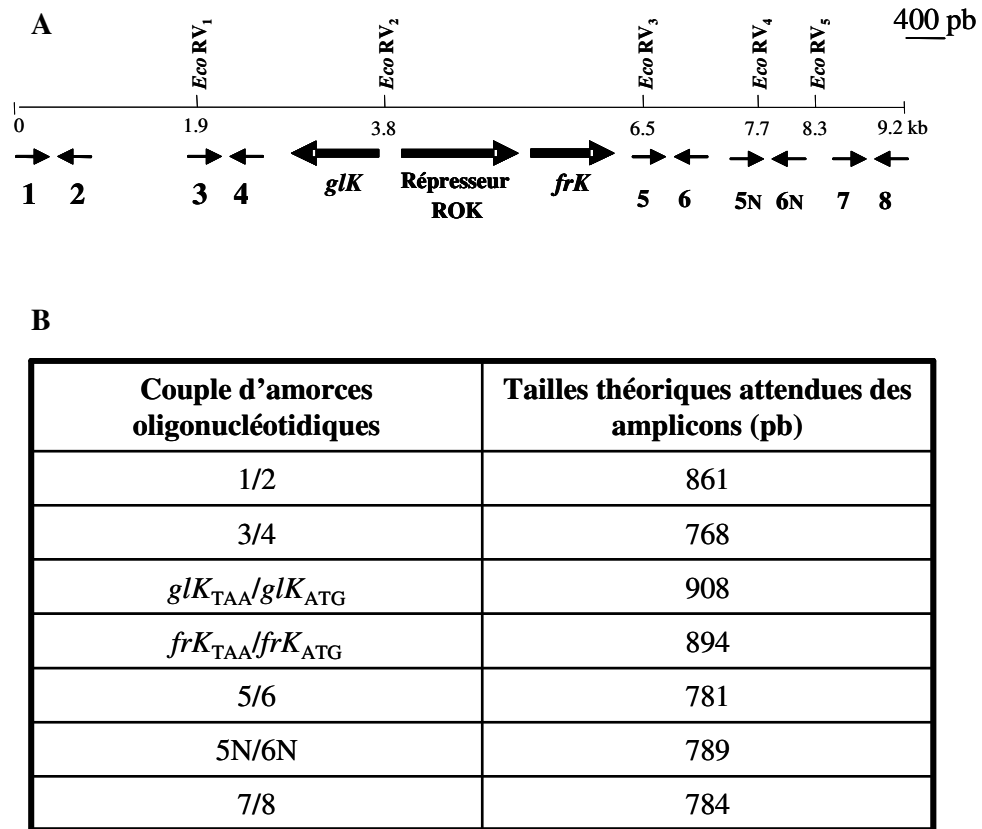


Figure RD 26. Localisation (A) des différents couples d'amorces oligonucléotidiques et tailles théoriques des amplicons (B) utilisés pour caractériser un fragment de 9,2 kb contenant le locus *frK* chez *B. longum* DJ010A.

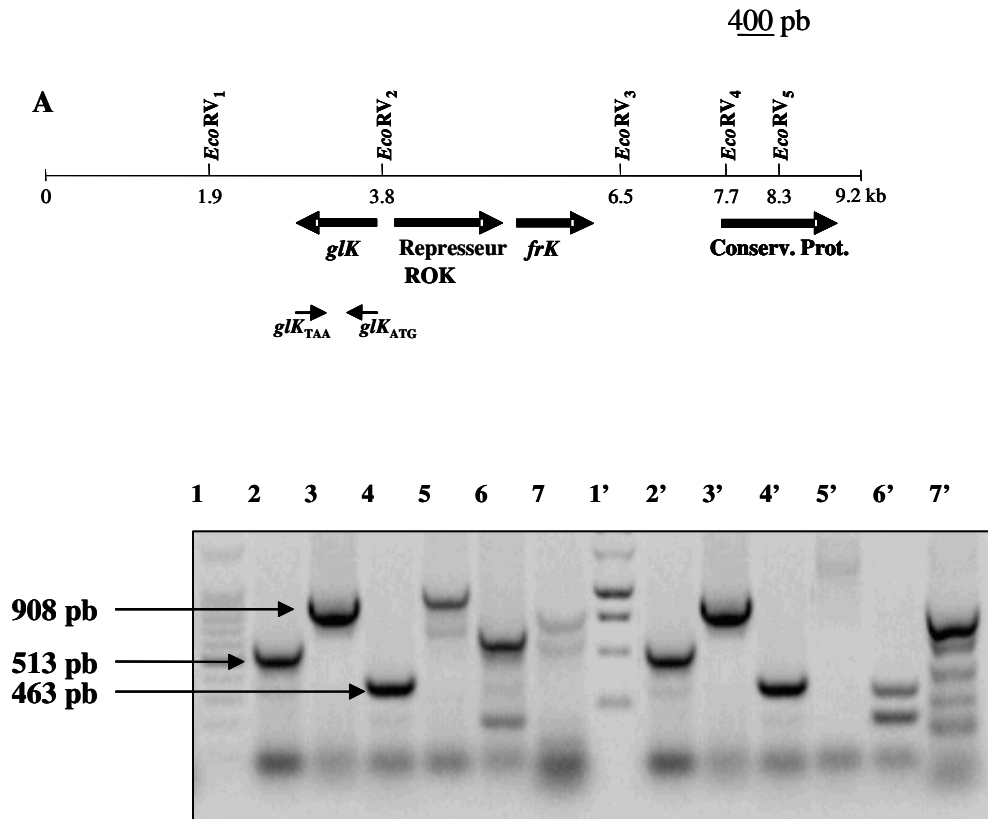


Figure RD 27. Analyse génotypique de la souche *B. longum* DSM20219 utilisant des amorces oligonucléotidiques spécifiques de la séquence du gène *glK*. **(A)** Localisation de l'amplicon *glK* (908 pb) par rapport au locus *frK* chez *B. longum* DJ010A. **(B)** Profil de séparation électrophorétique des produits d'amplification par PCR obtenus lors de l'amplification de l'ADN_g de *B. longum* A10C (pistes de 2 à 4 et de 2' à 4') et de *B. longum* DSM20219 (pistes de 5 à 7 et de 5' à 7') par les couples d'amorces oligonucléotidiques suivants: *glK*_{ATG}/*glK*_{DW} (pistes 2, 2', 5 et 5'), *glK*_{ATG}/*glK*_{TAA} (piste 3, 3', 6 et 6'), *glK*_{UP}/*glK*_{TAA} (piste 4, 4', 7 et 7'). Pistes 1 et 1', témoins de masse moléculaire (Roche). La réaction d'amplification a été réalisée à 55 °C (pistes de 2 à 7) et à 57°C (pistes de 2' à 7').

de lecture et contient un codon putatif d'initiation de la transcription (ATG). A l'extrémité opposée de ce cadre de lecture, un codon putatif de fin de la transcription (TAA) a été identifié par analyse bioinformatique et inclus dans la séquence de l'amorce *glK*_{TAA}. Une amplification de l'ADNg de *B. longum* A10C par les amorces *glK*_{ATG}/*glK*_{TAA} conduit à un produit d'amplification d'environ 903 pb (Figure RD 27, piste 3, page 165).

A l'aide des deux amorces oligonucléotidiques supplémentaires (*glK*_{UP} et *glK*_{DW}), internes à la séquence du gène *glK* et entourant un site de restriction *Nde*I, deux réactions d'amplifications additionnelles ont été réalisées. Le couple d'amorces *glK*_{ATG}/*glK*_{DW} conduit, dans le cas de la souche A10C, à un produit d'amplification d'environ 513 pb (Figure RD 27, piste 2, page 165). A partir de la même matrice d'ADN, le couple *glK*_{TAA}/*glK*_{UP} fournit un amplicon d'environ 463 pb (Figure RD 27, piste 4, page 165).

Lorsque ces trois couples d'oligonucléotides sont utilisés pour amplifier les régions homologues du chromosome de la souche DSM20219, le profil de séparation électrophorétique des produits d'amplification est différent (Figure RD 27, pistes de 5, 6 et 7, 5', 6' et 7', page 165). Dans aucun des cas, la taille des produits d'amplification ne correspond à la taille théorique calculée. Les bandes de faible intensité détectées se sont révélées, après séquençage, des produits non spécifiques d'amplification.

Ces résultats nous ont permis de conclure qu'aucun des trois couples d'amorces définis à partir de la séquence nucléotidiques du gène *glK* ne s'hybride de façon spécifique sur la séquence chromosomique de *B. longum* DSM20219. Ces informations suggèrent la présence chez cette souche, d'une délétion située entre l'extrémité 3' du gène *glK* et l'extrémité 3' du gène *frK* (Figure RD 26, page 164).

V. 2. 1. 3. Analyse d'un fragment chromosomique situé 2,5 kb en amont du locus *glK*

Deux couples d'amorces appelés 1/2 et 3/4 ont été permis d'analyser la structure d'une séquence chromosomique localisée 2,5 Kb en amont du locus *glK* (Figure RD 28 et RD 29, pages 167 et 168, respectivement).

a) amorces 1/2

Une analyse bioinformatique de la séquence génomique de *B. longum* DJ010A montre que l'amorce 1 s'hybride 5,3 Kb en amont du codon ATG du gène *frK* (Figure RD 28A, page 167). L'amorce 2 correspond à une séquence nucléotidique de 22 pb localisée sur le brin antisens et 4,4 Kb pb en amont du codon d'initiation de la transcription du gène *frK* (Figure RD 28A, page 167). La taille attendue de l'amplification par PCR de l'ADNg de *B. longum* par le couple d'amorces 1/2 est donc de 861 pb.

Lorsque l'ADNg de *B. longum* A10C est utilisé comme matrice (Figure RD 28B, pistes 1 et 3, page 167), ce couple d'amorces oligonucléotidiques permet l'amplification de trois fragments nucléotidiques différents. Après séparation sur gel d'agarose et visualisation par coloration au BET, trois bandes de tailles et intensités différentes peuvent être visualisées : une bande de forte intensité, d'environ 861 pb qui correspond à la taille calculée de l'amplicon, ainsi que deux autres bandes correspondant aux produits non spécifiques (Figure RD 28B, pistes 1 et 3, page 167).

Le profil de séparation des produits d'amplification de l'ADNg de *B. longum* DSM20219 par le même couple d'amorces est identique à celui obtenu pour la souche Fru⁺

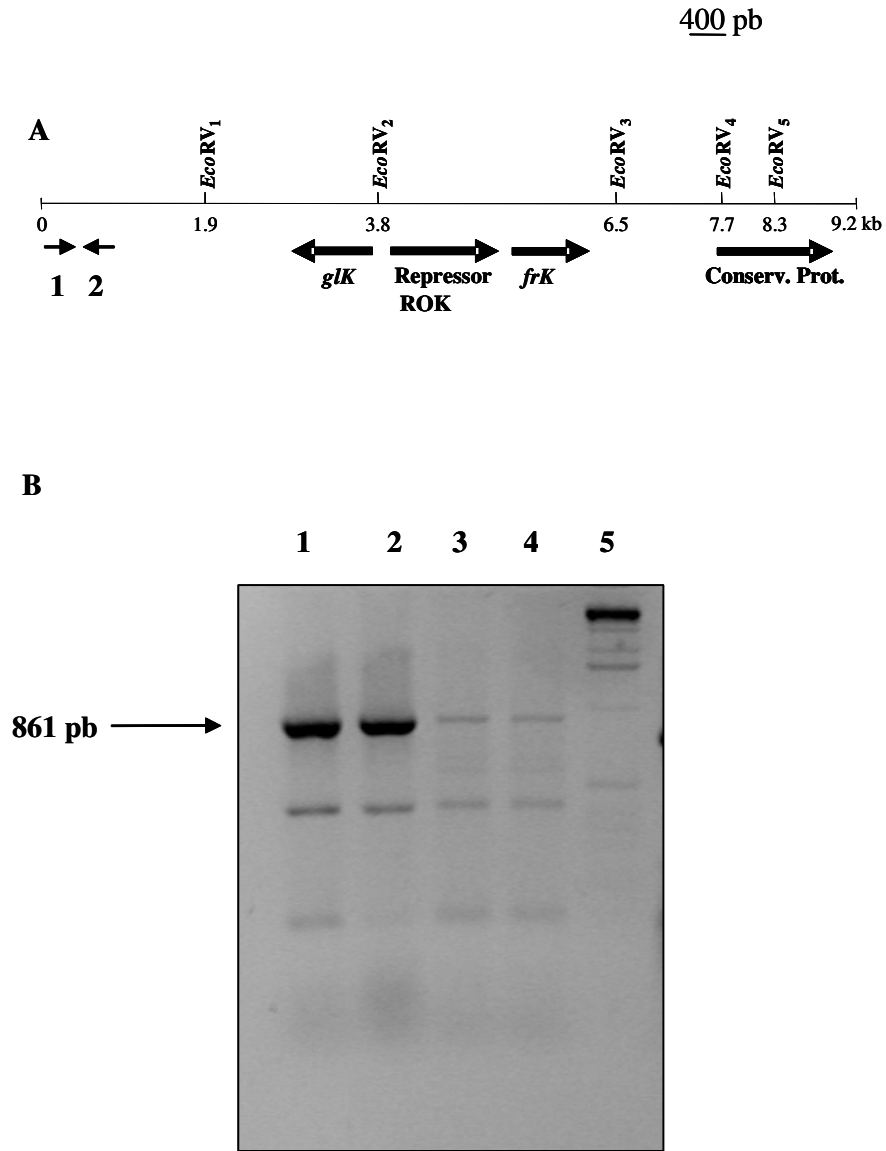


Figure RD 28. Analyse génotypique de la souche *B. longum* DSM20219 utilisant le couple d'amorces 1/2 . (A) Localisation de la sonde 1/2 (861 pb) par rapport au locus *frK* chez *B. longum* DJ010A. (B) Profil de séparation sur gel d'agarose (1,5%) des produits d'amplification par PCR de l'ADNg de *B. longum* A10C (pistes 1 et 3) et *B. longum* DSM20219 (pistes 2 et 4). La réaction d'hybridation des amorces 1 et 2 a été réalisée à 55°C (pistes 1 et 3) et à 57°C (pistes 2 et 4). Piste 5, témoin de masse moléculaire X.

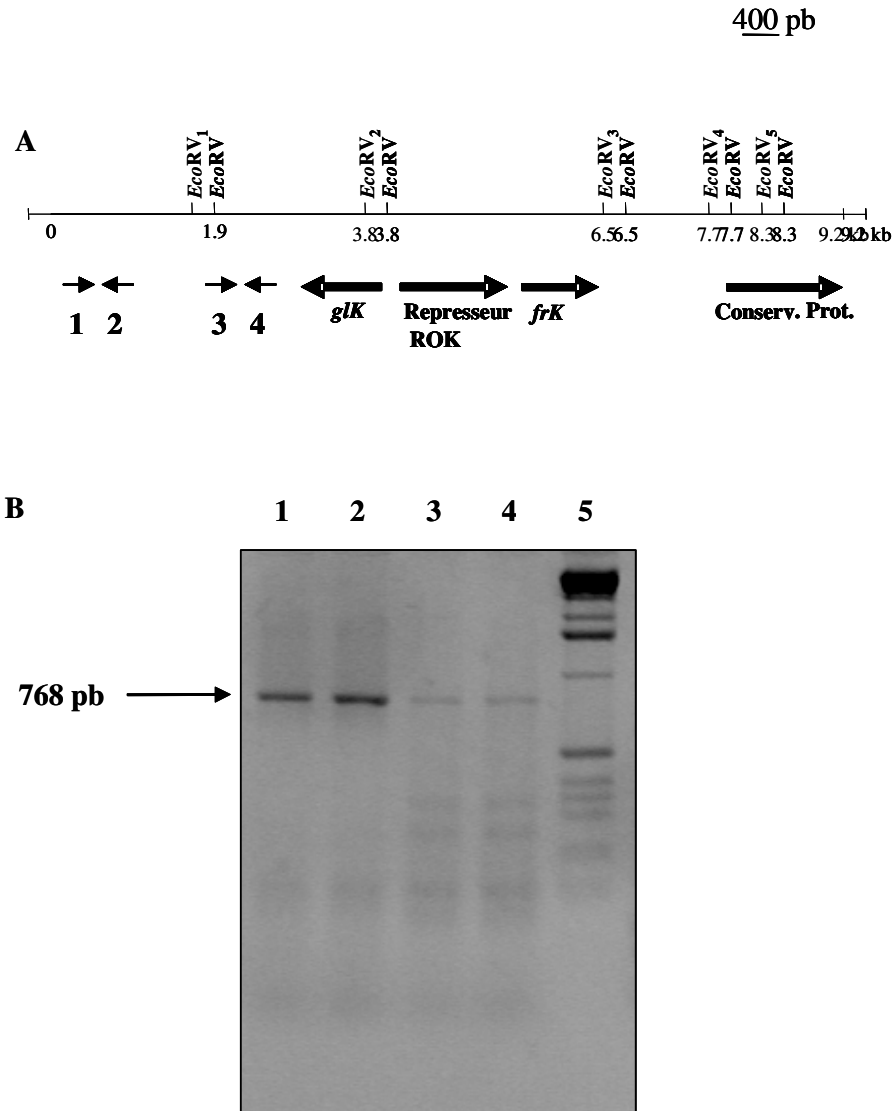


Figure RD 29. Analyse génotypique de la souche *B. longum* DSM20219 utilisant le couple d'amorces 3/4. **(A)** Localisation de la sonde 3/4 (768 pb) par rapport au locus *frK* chez *B. longum* DJ010A. **(B)** Profil de séparation sur gel d'agarose (1,5%) des produits d'amplification par PCR de l'ADNg de *B. longum* A10C (pistes 1 et 3) et *B. longum* DSM20219 (pistes 2 et 4). La réaction d'hybridation des amorces 3 et 4 a été réalisée à 55°C (pistes 1 et 3) et à 57°C (pistes 2 et 4). Piste 5, témoin de masse moléculaire X (Roche).

(Figure RD 28B, pistes 2 et 4, page 167). Ce résultat suggérerait que le fragment de 861 pb correspondant à la séquence nucléotidique comprise entre les amorces 1 et 2 se trouverait sur le chromosome des deux souches de *B. longum* analysées.

b) Amorces 3/4

Par la suite, un deuxième couple d'amorces (3/4), contigu du locus *frK* a été utilisé pour délimiter plus précisément le fragment potentiellement délété chez *B. longum* DSM20219. Chez *B. longum* DJO10A, les amorces 3 et 4 sont situées 3,4 Kb et 2,6 Kb en amont du codon ATG du gène *frK* (Figure RD 29A, page 168). Utilisées conjointement dans une réaction d'amplification par PCR sur l'ADN_g de *B. longum* ce couple d'amorces

permettrait donc, l'obtention d'un amplicon de 768 pb. Lorsque l'ADN_g de *B. longum* A10C sert de matrice, une seule bande d'environ 768 pb est obtenue (Figure RD 29B, pistes 1 et 3, page 168). Un même profil est obtenu lors de l'amplification de l'ADN_g de *B. longum* DSM20219 par ce couple d'amorces (Figure RD 29B, pistes 2 et 4, page 168).

Cela confirme la présence de ce fragment d'ADN dans le génome des deux souches analysées.

V. 2. 1. 4. Analyse d'un fragment chromosomique situé 2,5 kb en aval du locus *frK*

A partir de la séquence chromosomique des deux souches séquencées de *B. longum* (DJ010A et NCC2705), trois couples d'amorces oligonucléotidiques, 5/6, 5N/6N et 7/8 ont été définis en aval du locus *frK*, dans le but de déterminer la séquence nucléotidique située en aval du locus *frK* chez les deux souches de *B. longum* disponibles au laboratoire (A10C et DSM20219) (Figures RD 30 A₁, RD 30A₂, RD 31 A₁ et RD 31A₂, pages 170 et 171).

Chez *B. longum* DJ010A, les amorces 5 et 6 sont localisées 922 et 141 pb en aval du codon TAA du gène *frK* (Figure RD 30A₁ et RD 30A₂, page 170). La taille théorique de produit d'amplification est donc de 784 pb. Une réaction d'amplification de l'ADN des souches A10C et DSM20219 par le couple d'amorces 5/6 ne permet pas l'obtention, dans les conditions utilisées, de ce produit (Figure RD 30B, page 170).

Une analyse de la séquence nucléotidique envoisinant le locus *frK* de *B. longum* DJ010A montre la présence chez cette souche, d'un fragment supplémentaire de 1200 pb inséré en aval de l'extrémité 3' de l'amorce 6. Par conséquent, un nouveau couple d'amorces, appelées 5N/6N prenant en compte cette séquence particulière, a été défini. Les amorces 5N et 6N sont localisées 1,2 et 1,9 Kb en aval du codon TAA du gène *frK* et permettent l'amplification d'un fragment de 791 pb (Figure RD 30A₁ et RD 30A₂, page 170).

Pour les deux souches utilisées, A10C et DSM20219, ce couple d'amorces conduit à un profil d'amplification par PCR qui ne concorde pas avec celui supputé par analyse bioinformatique de la séquence chromosomique de *B. longum* NCC2705 (Figure RD 30B, page 170).

Pour atteindre l'objectif proposé, un troisième couple d'amorces oligonucléotidiques, nommé 7/8 et localisé 3 kb en aval du locus *frK*, a donc été défini. Ces amorces permettraient, selon les calculs bioinformatiques, l'amplification d'un fragment de 784 pb (Figure RD 31A₁ et 31A₂, page 171). Le couple d'amorces 7/8 a permis d'amplifier, à partir de l'ADN_g de *B. longum* A10C, un fragment nucléotidique d'environ

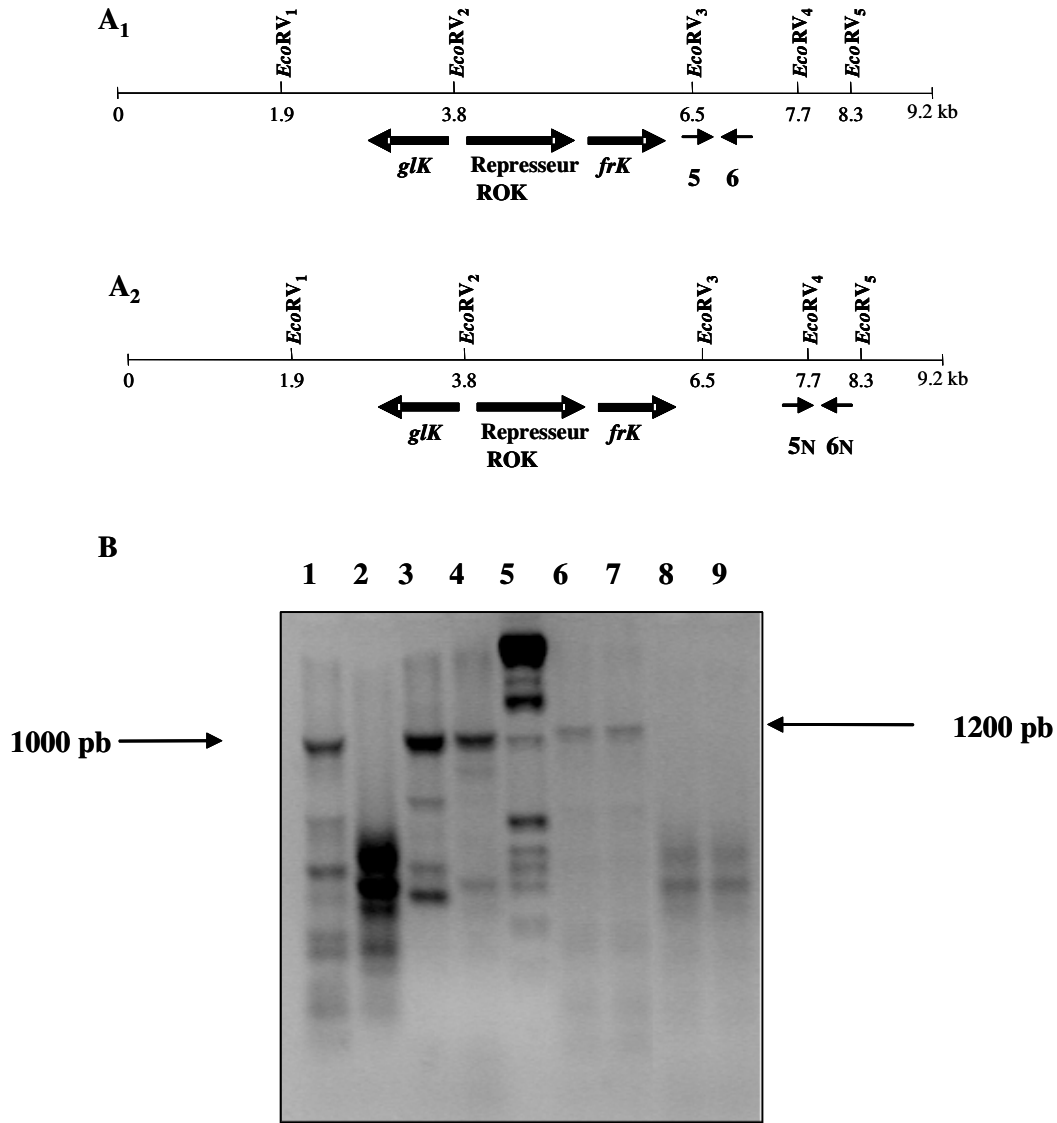


Figure RD 30. Analyse génotypique de la souche *B. longum* DSM20219 utilisant le couple d'amorces 5/6 et 5N/6N. (**A₁**) Localisation de la sonde 5/6 (781 pb) par rapport au locus *frK* chez *B. longum* NCC2705. (**A₂**) Localisation de la sonde 5N/6N (791 pb) par rapport au locus *frK* chez *B. longum* DJ010A. (**B**) Profil de séparation sur gel d'agarose (1,5%) des produits d'amplification par PCR de l'ADNg de *B. longum* A10C (pistes 1, 3, 6 et 8) et de *B. longum* DSM20219 (pistes 2, 4, 7 et 9). La réaction d'amplification a été réalisée avec les amorces 5/6 (pistes de 1 à 4) et 5N/6N (pistes de 6 à 9). Les températures utilisées pour l'hybridation des amorces sont 55°C (pistes 1, 2, 6 et 7) et 57°C (pistes 3, 4, 8 et 9). Piste 5, témoin de masse moléculaire X.

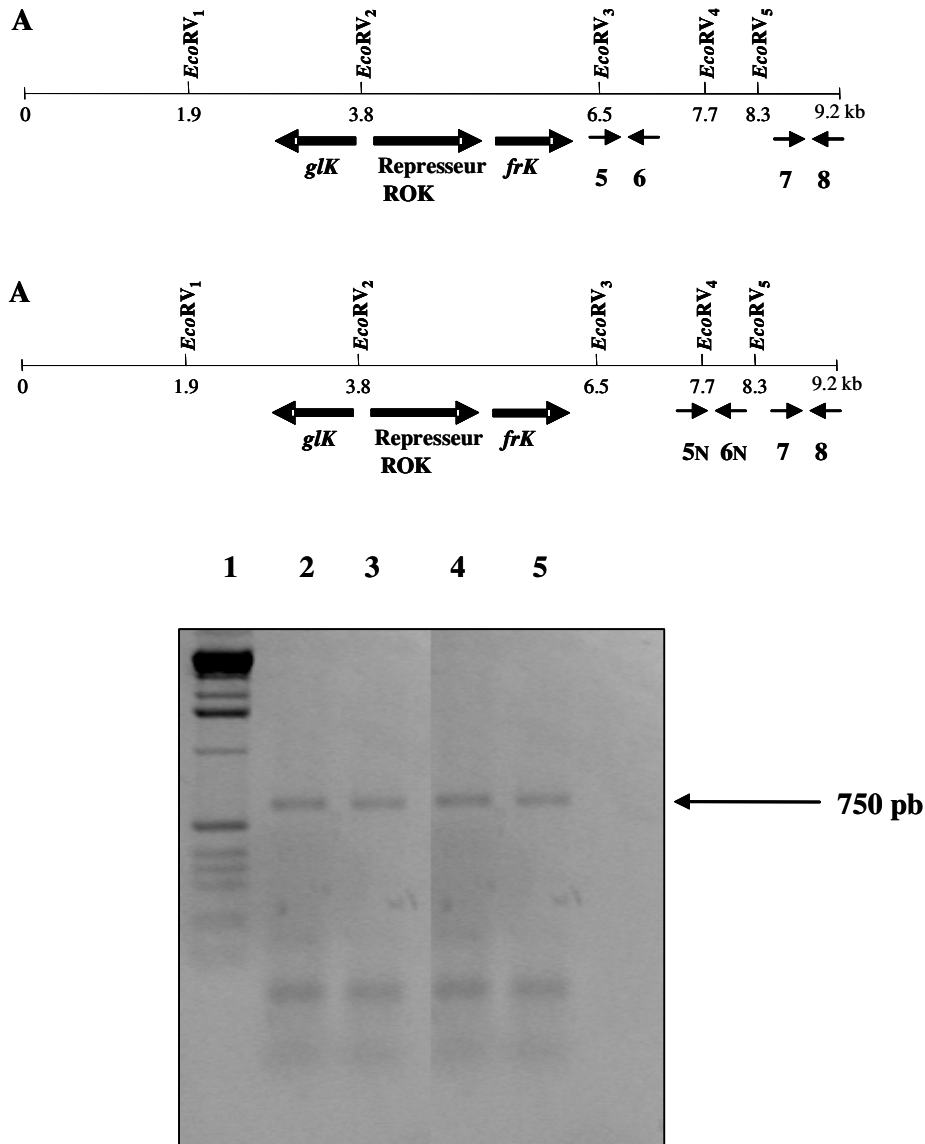


Figure RD 31. Analyse génotypique du phénotype *Fru*⁻ de la souche *B. longum* DSM20219 utilisant le couple d'amorces 7/8. (**A₁**) Localisation de la sonde 7/8 (784 pb) par rapport au locus *frK* chez *B. longum* NCC2705. (**A₂**) Localisation de la sonde 7/8 (784 pb) par rapport au locus *frK* chez *B. longum* DJ010A. (**B**) Profil de séparation sur gel d'agarose (2%) des produits d'amplification par PCR de l'ADNg de *B. longum* A10C (pistes 2 et 4) et de *B. longum* DSM20219 (pistes 3 et 5). Les températures utilisées pour l'hybridation des amorces sont de 55°C (pistes 2 et 3) et de 57°C (pistes 4 et 5). Piste 1, témoin de masse moléculaire X.

784 pb (Figure RD 31B, piste 2, page 171). Le même profil est obtenu lors de l'amplification de l'ADN_g de *B. longum* DSM20219 (Figure RD 31B, piste 3, page 171).

Lorsque la température d'hybridation est augmentée de 55°C à 57 °C, cette bande représente le produit majeur d'amplification (Figure RD 31B, pistes 4 et 5, page 171). Ceci suggérerait que, dans le cas des deux souches, le couple d'amorces 7/8 permet l'amplification d'un seul fragment d'ADN de taille qui concorde avec la taille théorique calculée à partir de la séquence chromosomique de *B. longum* (DJ010A et NCC2705).

Il apparaît donc, que chez *B. longum* DSM20219, la région chromosomique délétée, responsable du phénotype Fru⁻, serait délimitée, en amont par l'extrémité 3' du primer 4, et en aval par l'extrémité 5' du primer 7.

V. 2. 2. Analyse génotypique de *B. longum* DSM20219 par technique d'hybridation (ADN-ADN) sur membrane

V. 2. 2. 1. Choix et analyse des sondes oligonucléotidiques

Les résultats d'analyse des profils d'amplification par PCR de l'ADN_g des souches A10C et DSM20219 par différents couples d'amorces oligonucléotidiques nous a permis de constater que, dans le cas des amorces 1/2, 3/4 et 7/8, la taille des produits d'amplification obtenus concordait avec la taille théorique estimée par calcul bioinformatique.

Dans le but de vérifier s'il s'agit, dans le cas des deux souches, d'un même produit d'amplification ou, par contre, de deux amplicons de séquences différentes mais de tailles identiques, nous avons fait appel à la technique d'hybridation sur membrane ADN-ADN. Ainsi, les produits issus de l'amplification de l'ADN_g de *B. longum* A10C par les couples d'amorces 1/2, 3/4 et 7/8 ont été découpés du gel, reamplifiés par le même couple d'amorces, marqués à la digoxigénine et utilisés comme sondes oligonucléotidiques.

Pour chaque souche (A10C et DSM20219), le produit obtenu lors de l'amplification de l'ADN_g par un des trois couples d'amorces utilisées, a été déposé sur gel d'agarose à 1,5% et puis transféré sur membrane Nylon+ (Amersham-Pharmacia). La souche A10C a été utilisée comme contrôle positif de la technique, alors que le plasmide pET28 a servi de témoin négatif.

Une réaction d'hybridation réalisée avec la sonde 1/2 a permis de détecter, dans le cas des deux souches, une seule bande d'environ 861 pb (Figure RD 32 C1/2, pistes 1, 2 et 3, page 173). Par conséquent, ce couple d'amorces permet l'amplification de la même séquence nucléotidique de 861 pb.

Lorsque l'amplicon 3/4 est utilisé comme sonde, une seule bande de 768 pb est révélée lors de la réaction de détection (Figure RD 32 C3/4, pistes 1, 2 et 3, page 173). Cela confirme la présence sur le génome de *B. longum* DSM20219 de la séquence nucléotidique délimitée par ces deux amorces.

Utilisée dans les mêmes conditions, la sonde 7/8 a permis la détection d'un seul fragment nucléotidique de 784 pb (Figure RD 32 C7/8, pistes 1, 2 et 3, page 173). Par conséquent, chez les deux catégories de souches analysées de *B. longum* (A10C et DSM20219), les amorces 7 et 8 s'hybrident sur une même séquence nucléotidique. Dans tous les cas, la bande détectée sur les troisièmes pistes constitue un contrôle d'hybridation des fragments nucléotidiques sur la membrane, ainsi qu'un contrôle de la réaction de détection (Figure RD 32 C, pistes 3, page 173). Dans toutes ces trois expériences, les sondes utilisées ne s'hybrident pas avec la séquence ADN du vecteur pET28 (Figure RD 32 C, pistes 4, page 173).

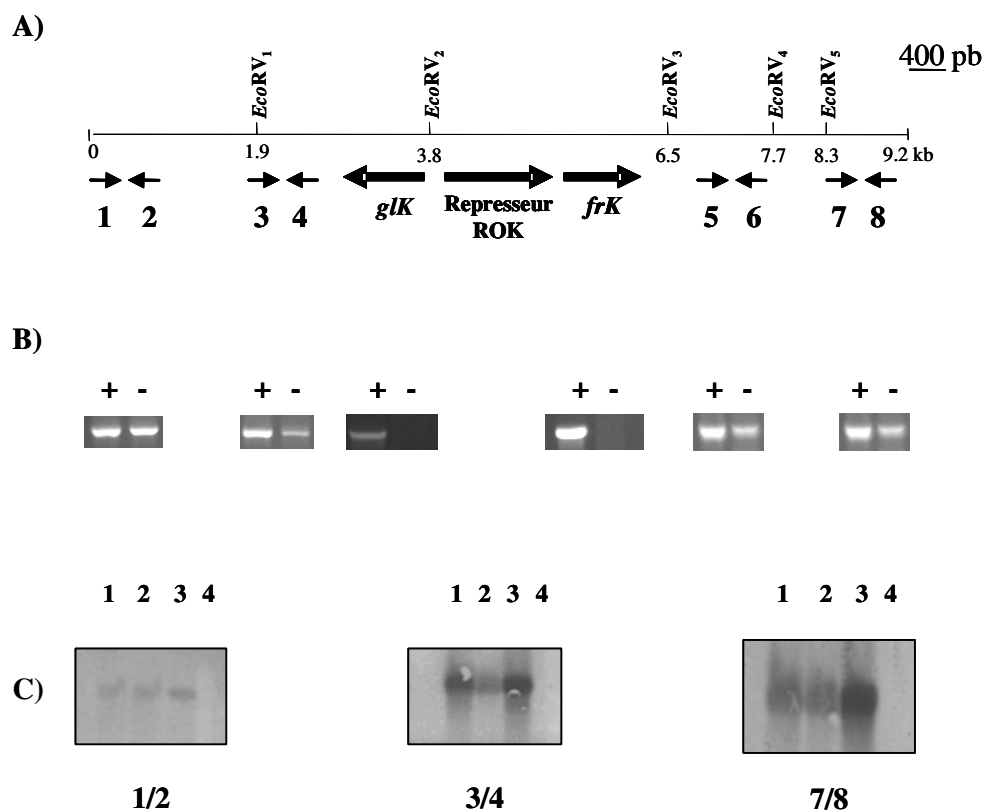


Figure RD 32. Caractérisation de la souche type *B. longum* DSM20219 utilisant la technique d'hybridation sur membrane ADN/ADN. **A)** Contexte génomique du locus *frK* chez *B. longum* DJ010A. **B)** Analyse des produits d'amplification de l'ADN_g de *B. longum* A10C (+) et de *B. longum* DSM20219 (-) par les couples d'amorces oligonucléotidiques 1/2, 3/4, *glK*_{ATG}/*glK*_{TAA}, *frK*_{ATG}/*frK*_{TAA}, 5/6 et 7/8, respectivement. **C)** Choix des sondes oligonucléotidiques. Chacune des trois sonde nucléotidiques utilisées (1/2, 3/4 et 7/8) a été hybridée avec le produit d'amplification de l'ADN_g de *B. longum* A10C (pistes 1) et de *B. longum* DSM20219 (pistes 2) par le couple d'amorces oligonucléotidiques utilisées pour la création de la sonde. Dans chacun des cas, la sonde à tester a été également déposée sur gel (pistes 3), comme contrôle positif de détection. Le plasmide pET28 a servi de contrôle négatif (pistes 4).

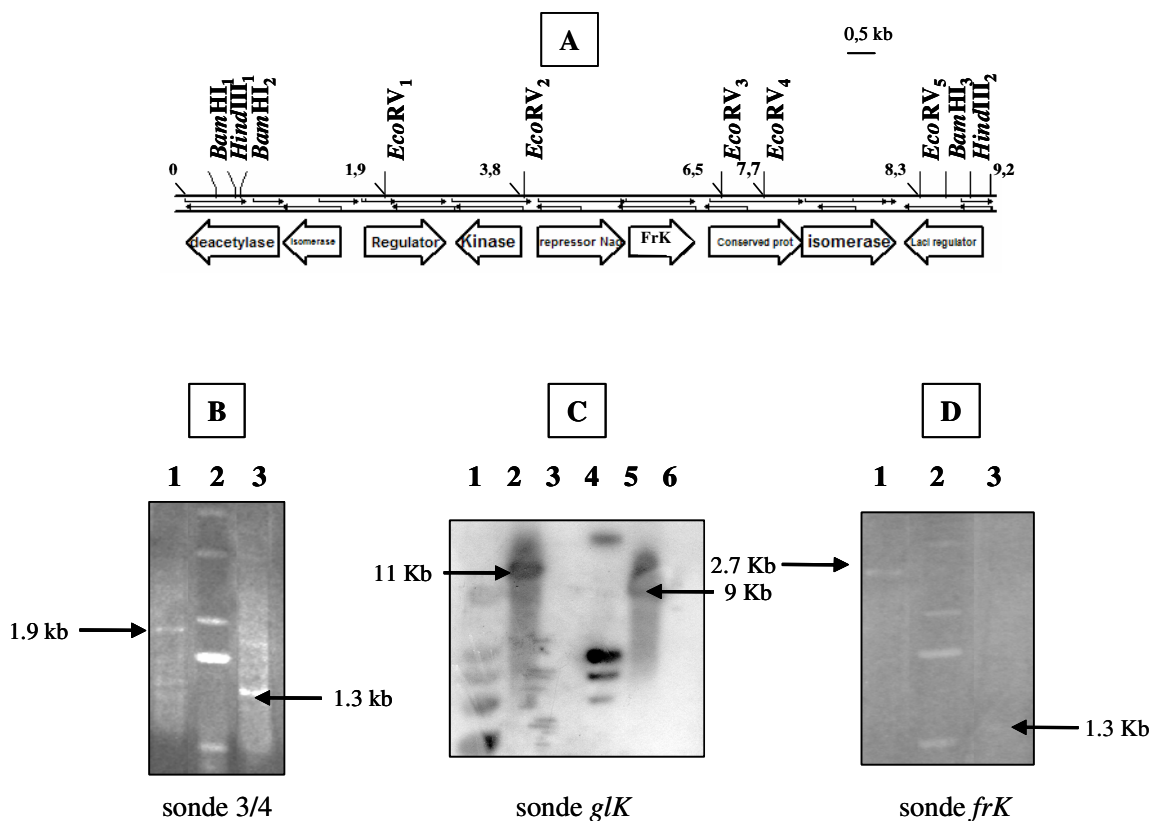


Figure RD 33. Analyse génotypique du phénotype *Fru*⁻ de la souche *B. longum* DSM20219 par hybridation sur membrane ADN-ADN utilisant les sondes nucléotidiques 3/4, *frK* et *glK* (A) Carte de restriction d'un fragment de 9.2 kb avoisinant le locus *frK* chez *B. longum* DJ0101A. La localisation des sites de digestion par les endonucléases *Bam*HI, *Eco*RV et *Hind*III est indiquée. (B) Fragments nucléotidiques détectés par la sonde 3/4. L'ADN_g de *B. longum* A10C (piste 1) et DSM20210 (piste 2) ont été digéré par l'endonucléase *Eco*RV. Piste 2, témoin de masse moléculaire X. (C) Fragments nucléotidiques détectés par la sonde *glK*. L'ADN_g de *B. longum* A10C (pistes 2 et 5) et DSM20219 (pistes 3 et 6) a été soumis à une digestion complète par les enzymes *Hind*III (pistes 2 et 3) et *Bam*HI (pistes 5 et 6). Pistes 1 et 4, témoin de masse moléculaire III (Roche). (D) Fragments nucléotidiques détectés par la sonde *frK*. L'ADN_g de *B. longum* A10C (piste 1') et de *B. longum* DSM20219 (piste 3') a été soumis à une digestion complète par l'enzyme *Eco*RV. Pistes 2 et 2', témoin de masse moléculaire X.

V. 2. 2. 2. Etude de la délétion par analyse du profil de restriction de trois endonucléases

Une analyse bioinformatique d'un fragment nucléotidique de 12 kb contenant le locus *frK* chez *B. longum* DJ010A indique la présence de cinq sites de restriction de l'enzyme *EcoRV* (notés de 1 à 5), de deux sites de restriction *HindIII* (notés 1 et 2) et de trois sites de restriction *BamHI* (notés 1, 2 et 3) (Figure RD 33A, page 174).

Les cinq sites *EcoRV* présents délimitent, au niveau de cette séquence, les fragments nucléotidiques suivants :

- un fragment de 1,95 Kb qui inclut la séquence des sondes 3/4 et *glK*, situé entre les sites de restriction *EcoRV*₁ et *EcoRV*₂,
- un fragment de 2,78 Kb situé entre les sites *EcoRV*₂ et *EcoRV*₃ qui inclut le gène *frK*,
- un fragment de 600 pb qui enferme la séquence délimitée par les amorces 5N et 6N, situé entre les sites *EcoRV*₃ et *EcoRV*₄
- une séquence de 2,2 Kb qui sépare les amorces 6N et 7, délimitée par les sites de restriction *EcoRV*₄ et *EcoRV*₅ (Figure RD 33A, page 174).

Les deux sites *HindIII* délimitent un fragment d'environ 11 Kb (Figure RD 33A, page 174). Les sites de restriction *BamHI*₂ et *BamHI*₃ sont séparés par 9,8 Kb (Figure RD 33A, page 174). A partir de ces informations, une analyse de la région délétée par étude du profil de restriction de l'ADN des deux souches de *B. longum* a été entreprise. Pour cela, les produits obtenus par digestion complète de l'ADN_g des souches DSM20219 et A10C par chaque endonucléase ont été transférés sur membrane de Nylon⁺ et révélés en utilisant les différentes sondes. Une analyse comparative des profils de détection obtenus pour les deux souches nous a permis d'estimer la taille totale de la délétion.

Dans un premier temps, l'ADN_g des deux souches de *B. longum* (A10C et DSM20219) a été digéré par l'enzyme *EcoRV*. Théoriquement, la sonde 3/4 devrait permettre la détection d'un seul fragment nucléotidique de 1,9 kb, alors que le fragment reconnu par la sonde *frK* aurait une taille de 2,7 Kb. En effet, lorsque l'ADN de la souche A10C est hybridé avec ces deux sondes, une bande de taille attendue est visible dans chaque cas, après la réaction de détection (Figure RD 33B et 33D, pistes 1, page 174). Par contre, dans le cas de *B. longum* DSM20219, les sondes 3/4 et *frK* détectent, chacune, un fragment de taille inférieure (1,3 Kb) (Figures RD 33B et 33D, pistes 3, page 174).

Pour confirmer l'absence complète du cadre de lecture du gène *glK*, indiquée par analyse PCR, ce gène a été utilisé comme sonde nucléotidique. *glK* a été employé dans une réaction d'hybridation avec l'ADN_g de *B. longum*, préalablement digéré par les enzymes *BamHI* et *HindIII* (Figure RD 33C, page 174). Comme attendu, l'analyse des profils d'hybridation avec l'ADN de la souche A10C indique la présence d'une bande d'environ 11 Kb (située entre deux sites *HindIII*) et d'une bande d'approximativement 9,8 Kb (délimitée par deux sites *BamHI*) (Figure RD 33C, page 174).

Ces informations, corroborés avec les résultats précédemment obtenus par la technique d'amplification par PCR, indiquent une délétion d'un fragment d'ADN d'environ 3,3 Kb chez *B. longum* DSM2019. Cette section chromosomique inclut les séquences des gènes codant pour la glucokinase putative GlcK, le répresseur putatif ROK et la fructokinase FrK.

V. 2. Complémentation *in vitro* de la souche mutante *B. longum* DSM20219 (frK⁻)

Dans le but de démontrer qu'une fructokinase est l'enzyme nécessaire et suffisante au métabolisme du fructose chez *B. longum*, deux stratégies ont été employées.

Dans un premier temps, nous avons montré que *B. longum* A10C (Fru⁺) possède une fructokinase très spécifique du fructose. Cette enzyme permet la fermentation du fructose par la voie de la F6PPK.

Puis, nous avons démontré que la souche type *B. longum* DSM20219 (Fru⁻) est incapable de fermenter le fructose en raison d'une délétion du gène *frK*. Cette souche possède toutes les enzymes de la voie de la F6PPK, mais elle est déficiente dans la séquence codant pour l'enzyme qui permet la conversion du fructose en fructose-6-phosphate. La dernière étape de cette étude a donc été de vérifier la capacité du lysat cellulaire de *B. longum* DSM20219 de dégrader le fructose en présence de la fructokinase purifiée de *B. longum* A10C.

Pour cela, l'extrait enzymatique de la souche DSM20219 (10 mg de protéines solubles) contenant 0,1 U de fructokinase (FrK) a été incubé en présence de fructose (1 g/L), d'ATP (10mM) et de MgCl₂ (10mM) dans du tampon phosphate (pH 6,5). L'extrait cellulaire de *B. longum* A10C a servi de contrôle positif pour la réaction de phosphorylation du fructose *in vitro*. Les produits obtenus après 15 minutes d'incubation à 37°C ont été séparés et visualisés par HPAEC-PAD. Les chromatogrammes obtenus dans les deux cas sont identiques et présentent un pic correspondant au fructose non-phosphorylé ($t_R = 3,24$), un pic correspondant au G6P ($t_R = 30,81$), un pic associé au F6P ($t_R = 32,24$) et un pic associé au S7P ($t_R = 32,76$) (Figure RD 34, page 177).

Par conséquent, l'enzyme FrK seule suffit à conférer à la souche *B. longum* DSM20219 un phénotype fructose positif.

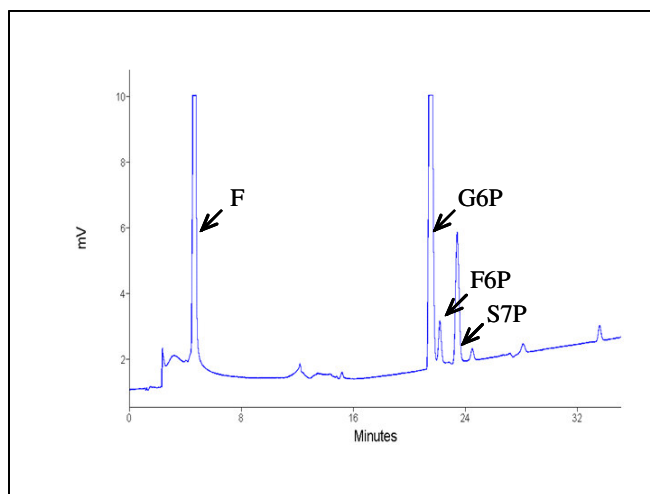


Figure RD 34. Complémentation enzymatique de *B. longum* DSM20219 par la fructokinase recombinante de *B. longum* A10C. Profil de séparation par HPAEC-PAD des produits de phosphorylation formés lors de l'incubation de l'extrait enzymatique de *B. longum* DSM20219 (10 mg de protéines solubles) avec la protéine FrK (0,1U) et du fructose (1g/L). Les pics de fructose (F), glucose-6-phosphate (G6P), fructose-6-phosphate (F6P) et du sédoheptulose-7-phosphate sont indiqués par une flèche .

Conclusions générales

La phosphorylation des monosaccharides est essentielle au métabolisme des composés glycosidiques par les bactéries. Cette réaction enzymatique est nécessaire non seulement pour permettre leur intégration dans une voie métabolique, mais aussi afin de maintenir ces monosaccharides dans l'espace intracellulaire. Par exemple, chez les bactéries, l'assimilation du D-fructose extracellulaire passe soit par un système de transport spécifique de type PEP :PTS, conduisant à la formation du fructose-1-phosphate, soit par une fructokinase intracellulaire (EC 2.7.1.4) transformant le fructose internalisé en fructose-6-phosphate.

La capacité des composés saccharidiques particuliers tels que les FOS à sélectionner les bifidobactéries a été largement démontrée. On sait aujourd'hui que l'un des facteurs essentiels expliquant cette sélectivité est la capacité de ces microorganismes à internaliser des petits polymères de fructose (DP <8) et de les dégrader *via* une β -fructofuranosidase cytoplasmique. Cependant, bien que la capacité de nombreuses espèces de *Bifidobacterium* à métaboliser le fructose soit bien connue, peu d'informations sont disponibles concernant les voies métaboliques impliquées. Chez les bifidobactéries, la voie principale du catabolisme saccharidique est la voie de la F6PPK (le « shunt bifide »). Nous avons donc entrepris d'identifier et de caractériser les enzymes impliquées dans l'intégration du fructose dans cette voie métabolique.

Une analyse par HPAEC-PAD du devenir intracellulaire du fructose incorporé par une souche de *Bifidobacterium longum* (A10C) a permis de mettre en évidence que ce monosaccharide était immédiatement converti en fructose-6-phosphate, puis intégré dans la voie de la F6PPK. La première enzyme impliquée dans le catabolisme du fructose semblait donc être une fructose-6-phosphate phosphotransférase (EC 2.7.1.4). Nous avons donc entrepris d'identifier le gène codant sa synthèse.

Lorsque ce travail a été initié, en 2001, aucune séquence génomique de *Bifidobacterium* sp. n'était disponible dans les banques de données. Nous disposions cependant au laboratoire d'une souche de *B. longum* (DSM20219) fructose négative (Fru⁻). Afin d'identifier le gène codant pour cette fructokinase, deux approches ont donc été menées en parallèle. Une approche par complémentation, soit en système homologue chez *B. longum* DSM20219, soit en système hétérologue chez *E. coli* K-12 et une approche de clonage par PCR. La première approche consistait en la création d'une banque génomique de *B. longum*, suivi du criblage de gain d'activité fructokinasiq ue des bactéries transformées. La deuxième approche a consisté à définir et à utiliser des oligonucléotides dégénérés afin de cloner directement le gène de la fructokinase de *B. longum* A10C. Ces oligonucléotides ont été définis à partir d'une analyse bioinformatique. Cette analyse nous a permis de définir des motifs peptidiques conservés dans les séquences primaires de fructokinases identifiées, de différentes espèces bactériennes.

Cependant, la publication en août et octobre 2002 des génomes de *B. longum* DJ010A et NCC2705 respectivement nous a conduit à modifier notre approche de travail. En effet, l'analyse de ces génomes a permis d'identifier un gène codant putativement pour une enzyme présentant 31% d'identité avec une fructokinase putative d'une archaebactérie (*Methanosarcina acetivorans*). A l'aide d'oligonucléotides définis pour cette séquence, nous avons pu amplifier par PCR ce gène et le cloner. Le sous clonage de ce gène (que nous avons appelé *frK*) sur le vecteur d'expression pET28 a permis de surproduire la protéine FrK et de la purifier. Une analyse biochimique révèle que la protéine FrK présente une forte activité fructokinase ATP-dépendante, avec une affinité équivalente pour les deux substrats (saccharidique, le fructose et nucléotidique, l'ATP). FrK est donc une fructokinase très spécifique du fructose, dont nous avons pu déterminer les optima de pH et

de température. Nous avons donc pu démontrer que le fructose est intégré dans la voie de la F6PPK par une fructokinase produite par le gène *frK*.

L'inductibilité de l'expression du gène *frK* par le fructose a également pu être démontré par une approche indirecte en comparant, par HPAEC-PAD, l'activité fructokinase développée par la souche A10C cultivée sur fructose ou sur glucose comme seule source de carbone.

Le phénotype fructose négatif de la souche DSM20219 de *B. longum* a également pu être précisé. Ainsi, nous avons pu montrer que cette souche était dépourvue d'activité fructokinase. En effet, si lorsqu'un extrait cellulaire de cette souche est incubé en présence de fructose, aucun métabolite du « shunt bifide » n'est détectable par HPAEC-PAD, la complémentation de cet extrait par 0,1 U de fructokinase FrK suffit à conduire à leur production et détection. Enfin, la caractérisation génotypique de cette souche a permis de mettre en évidence que *B. longum* DSM20219 présentant une délétion d'environ 3,3 Kb contenant l'intégralité du gène *frK*, ce qui expliquerait le phénotype Fru⁻ observé.

La protéine FrK est donc nécessaire et suffisante pour permettre l'intégration du fructose dans la voie de la F6PPK chez *Bifidobacterium longum*.

Bibliographie

1. **Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J.** 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, **215**: 403-410.
2. **Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.*, **25**: 3389-3402. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
3. **Andaloussi, S. A., H. Talbaoui, R. Marczak, and R. Bonaly.** 1995. Isolation and characterization of exocellular polysaccharides produced by *Bifidobacterium longum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**:995–1000.
4. **Anderson RL, Sapico VL.** 1975. D-fructose (D-mannose) kinase. *Methods Enzymol.* **42**:39-43.
5. **Angell S, Schwarz E, Bibb MJ.** 1992. The glucose kinase gene of *Streptomyces coelicolor* A3(2): its nucleotide sequence, transcriptional analysis and role in glucose repression. *Mol Microbiol.* **6**(19):2833-44.
6. **Angell S, Lewis CG, Buttner MJ, Bibb MJ.** 1994. Glucose repression in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a likely regulatory role for glucose kinase. *Mol Gen Genet.* **244**(2):135-43.
7. **Antelmann H, Engelmann S, Schmid R, Sorokin A, Lapidus A, Hecker M.** 1997. Expression of a stress- and starvation-induced dps/pexB-homologous gene is controlled by the alternative sigma factor sigmaB in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **179**(23):7251-6.
8. **Argnani, A., R. J. Leer, N. van Luijk, and P. H. Pouwels.** 1996. A convenient and reproducible method to genetically transform bacteria of the genus *Bifidobacterium*. *Microbiology.* **142**:109-114.
9. **Aulkemeyer P, Ebner R, Heilenmann G, Jahreis K, Schmid K, Wrieden S, Lengeler JW.** 1991. Molecular analysis of two fructokinases involved in sucrose metabolism of enteric bacteria. *Mol Microbiol.* **5**(12):2913-22.
10. **Bahaka D, Neut C, Khattabi A, Monget D, Gavini F.** 1993. Phenotypic and genomic analyses of human strains belonging or related to *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, and *Bifidobacterium breve*. *Int J Syst Bacteriol.* **43**(3):565-73.
11. **Bandlish RK, Michael Hess J, Epting KL, Vieille C, Kelly RM.** 2002. Glucose-to-fructose conversion at high temperatures with xylose (glucose) isomerases from *Streptomyces murinus* and two hyperthermophilic *Thermotoga* species. *Biotechnol Bioeng.* **80**(2):185-94.

12. **Beachey EH.** 1981. Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surface. *J Infect Dis.* **143**(3):325-45.
13. **Beerens H.** 1991. Detection of bifidobacteria by using propionic acid as a selective agent. *Appl Environ Microbiol.* **57**(8):2418-9.
14. **Benno Y, Sawada K, Mitsuoka T.** 1984. The intestinal microflora of infants: composition of fecal flora in breast-fed and bottle-fed infants. *Microbiol Immunol.* **28**(9):975-86.
15. **Berg RD.** 1996. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol.* **4**(11):430-5.
16. **Bettelheim, K.A., Breardon, A., Faiers, M. C. O'Farrel, S.M.** 1974. The origin of O serotypes of *Escherichia coli* in babies after normal delivery. *J. Hyg. (Lond).* **72**: 67-70.
17. **Biavati, B., V. Scardovi, and W. E. C. Moore.** 1982. Electrophoretic patterns of proteins in the genus *Bifidobacterium* and proposal of four new species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **32**:368-373.
18. **Biavati B, Castagnoli P, Crociani F, Trovatelli LD.** 1984. Species of the *Bifidobacterium* in the feces of infants. *Microbiologica.* **7**(4):341-5.
19. **Biavati B, Castagnoli P, Trovatelli LD.** 1986. Species of the genus *Bifidobacterium* in the feces of human adults. *Microbiologica.* **9**(1):39-45.
20. **Biavati B, Mattarelli P.** 1991. *Bifidobacterium ruminantium* sp. nov. and *Bifidobacterium merycicum* sp. nov. from the rumens of cattle. *Int J Syst Bacteriol.* **41**(1):163-8.
21. **Biavati B, Mattarelli P, Crociani F.** 1992. Identification of bifidobacteria from fermented milk products. *Microbiologica.* **15**(1):7-13.
22. **Billot-Klein D, Shlaes D, Bryant D, Bell D, van Heijenoort J, Gutmann L.** 1996. Peptidoglycan structure of *Enterococcus faecium* expressing vancomycin resistance of the VanB type. *Biochem J.* **313** (Pt 3):711-5.
23. **Blauroch, G.** 1937. Zur Physiologie der *Bifidusbakterien*. *M Schr. Kinderheilk.* **68**: 304-309.
24. **Bockmann J, Heuel H, Lengeler JW.** 1992. Characterization of a chromosomally encoded, non-PTS metabolic pathway for sucrose utilization in *Escherichia coli* EC3132. *Mol Gen Genet.* **235**(1):22-32.
25. **Bourget N, Simonet JM, Decaris B.** 1993. Analysis of the genome of the five *Bifidobacterium breve* strains: plasmid content, pulsed-field gel electrophoresis genome size estimation and *rrn* loci number. *FEMS Microbiol Lett.* **110**(1):11-20.

26. **Bradford, MM.** 1976. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.
27. **Brook I, Barrett CT, Brinkman CR 3rd, Martin WJ, Finegold SM.** 1979. Aerobic and anaerobic bacterial flora of the maternal cervix and newborn gastric fluid and conjunctiva: a prospective study. *Pediatrics*. **63**(3):451-5.
28. **van den Broek LA, Struijs K, Verdoes JC, Beldman G, Voragen AG.** 2003. Cloning and characterization of two alpha-glucosidases from *Bifidobacterium adolescentis* DSM20083. *Appl Microbiol Biotechnol*. **61**(1):55-60. Epub 2003 Jan 25.
29. **Bruckner R, Titgemeyer F.** 2002. Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS Microbiol Lett*. **209**(2):141-8.
30. **Buchanan, R.E., Gibbons, N. E.,** 1974. In «Bergey's Manual of Determinative Bacteriology », 8th ed., Williams et Wilkens CO., Baltimore, USA.
31. **Busby S, Ebright RH.** 1999. Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *J Mol Biol*. **293**(2):199-213.
32. **Camacho-Rubio, F., Jurado-Alameda, A., Gonzales-Tello, P., Luzon-Gonzales, G.** 1995. Kinetic study of fructose-glucose isomerization in a recirculator reactor. *Can. J. Chem. Eng.* **73** : 935-940.
33. **Canchaya C, Proux C, Fournous G, Bruttin A, Brussow H.** 2003. Prophage genomics. *Microbiol Mol Biol Rev*. **67**(2):238-76
34. **Canchaya C, Fournous G, Chibani-Chennoufi S, Dillmann ML, Brussow H.** 2003. Phage as agents of lateral gene transfer. *Curr Opin Microbiol*. **6**(4):417-24.
35. **Carlson DM.** 1968. Structures and immunochemical properties of oligosaccharides isolated from pig submaxillary mucins. *J Biol Chem*. **243**(3):616-26.
36. **Catteau M, Henry M, Beerens H.** 1971. Deconjugation of bile salts by bacteria of the genera *Bacteroides* and *Bifidobacterium*. *Ann Inst Pasteur Lille*. **22**:201-5.
37. **Chai W, Hounsell EF, Cashmore GC, Rosankiewicz JR, Feeney J, Lawson AM.** 1992. Characterisation by mass spectrometry and ¹H-NMR of novel hexasaccharides among the acidic O-linked carbohydrate chains of bovine submaxillary mucin. *Eur J Biochem*. **207**(3):973-80.
38. **Chalumeau H, Delobbe A, Gay P.** 1978. Biochemical and genetic study of D-glucitol transport and catabolism in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*. **134**(3):920-8.

39. **Chung CT, Niemela SL, Miller RH.** 1989. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **86**(7):2172-5.
40. **Coates, M., E., Fuller, R.** 1977. The gnotobiotic animal in the study of gut microbiology. Clarke & Bauchop, pp: 311-342.
41. **Collyer CA, Henrick K, Blow DM.** 1990. Mechanism for aldose-ketose interconversion by D-xylose isomerase involving ring opening followed by a 1,2-hydrate shift. *J Mol Biol.* **212**(1):211-35.
42. **Condon, S.** 1987. Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiol. Rev.* **46**: 269-280.
43. **Cooperstock, M. S., and A. J. Zedd.** 1983. Intestinal flora of infants, p. 79-99. In D. J. Hentges (ed.), Human intestinal microflora in health and disease. *Academic Press*, New York, N.Y.
44. **Conway, P.** 1996. Selection criteria for probiotic micro-organisms. *Asia Pacific Journal for Clinical Nutrition.* **5** :10-14.
45. **Corfield AP, Wagner SA, O'Donnell LJ, Durdey P, Mountford RA, Clamp JR.** 1993. The roles of enteric bacterial sialidase, sialate O-acetyl esterase and glycosulfatase in the degradation of human colonic mucin. *Glycoconj J.* **10**(1):72-81.
46. **Corneau, N., LaPointe, G. and Emond, E.** 2002. Direct Submission. NC_004768
47. **Corneau N, Emond E, LaPointe G.** 2004. Molecular characterization of three plasmids from *Bifidobacterium longum*. *Plasmid.* **51**(2):87-100.
48. **Cox RP, Marling N.** 1992. High-affinity oxygen uptake by *Bifidobacterium bifidum*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **62**(4):291-7.
49. **de Crecy-Lagard V, Binet M, Danchin A.** 1995. Fructose phosphotransferase system of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*: characterization of the *fruB* gene. *Microbiology.* **141** (Pt 9):2253-60.
50. **Crociani F, Alessandrini A, Mucci MM, Biavati B.** 1994. Degradation of complex carbohydrates by *Bifidobacterium* spp. *Int J Food Microbiol.* **24**(1-2):199-210.
51. **Crociani F, Biavati B, Alessandrini A, Chiarini C, 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**(2):564-71.
52. **Cummins, CS, Glendenning, OM.** 1957. Composition of the cell wall of *Lactobacillus bifidus*. *Nature.* **180**(4581):337-8.

53. **Degnan, B. A., and G. T. Macfarlane.** 1994. Synthesis and activity of alpha-glucosidase produced by *Bifidobacterium pseudolongum*. **Curr. Microbiol.** 29:43-47.
54. **Degnan BA, Macfarlane GT.** 1991. Comparison of carbohydrate substrate preferences in eight species of bifidobacteria. *FEMS Microbiol Lett.* **68**(2):151-6.
55. **Dentan, E., Sozzi, T., Bauer, H.** 1970. The morphology of two *Lactobacillus* bacteriophages. *J. Microscopie* **9** (4): 567-570.
56. **Derensy-Dron D, Krzewinski F, Brassart C, Bouquelet S.** 1999. Beta-1,3-galactosyl-N-acetylhexosamine phosphorylase from *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082: characterization, partial purification and relation to mucin degradation. *Biotechnol Appl Biochem.* **29** (Pt 1):3-10.
57. **Doelle, H. W.** 1969. Bacterial metabolism. New York, *Academic Press*, p: 148-152.
58. **Dong X, Xin Y, Jian W, Liu X, Ling D.** 2000. *Bifidobacterium thermacidophilum* sp. nov., isolated from an anaerobic digester. *Int J Syst Evol Microbiol.* **50** Pt 1:119-25.
59. **Dossonnet V, Monedero V, Zagorec M, Galinier A, Perez-Martinez G, Deutscher J.** 2000. Phosphorylation of HPr by the bifunctional HPr Kinase/P-ser-HPr phosphatase from *Lactobacillus casei* controls catabolite repression and inducer exclusion but not inducer expulsion. *J Bacteriol.* **182**(9):2582-90.
60. **Drasar, B.S. and Hill, M.J.** 1974. In Human Intestinal Flora, pp. 233-234, Academic Press, New York.
61. **Dumortier V, Montreuil J, Bouquelet S.** 1990. Primary structure of ten galactosides formed by transglycosylation during lactose hydrolysis by *Bifidobacterium bifidum*. *Carbohydr Res.* **201**(1):115-23.
62. **Dumortier, V., C. Brassart, and S. Bouquelet.** 1994. Purification and properties of a alpha-D-galactosidase from *Bifidobacterium bifidum* exhibiting a transgalactosylation reaction. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **19**:341-354.
63. **Ehrmann MA, Korakli M, Vogel RF.** 2003. Identification of the gene for beta-fructofuranosidase of *Bifidobacterium lactis* DSM10140(T) and characterization of the enzyme expressed in *Escherichia coli*. *Curr Microbiol.* **46**(6):391-7.
64. **Egeter O, Bruckner R.** 1996. Catabolite repression mediated by the catabolite control protein CcpA in *Staphylococcus xylosus*. *Mol Microbiol.* **21**(4):739-49.
65. **Eggerth, A., H.,** 1935. The Gram-positive non-spore-bearing anaerobic bacilli of human faeces. *J. Bact.* **30**: 277-279.

-
66. **Englyst HN, Trowell H, Southgate DA, Cummings JH.** 1987. Dietary fiber and resistant starch. *Am J Clin Nutr.* **46**(6):873-4.
67. **Euzeby JP, Tindall BJ.** 2001. Nomenclatural type of orders: corrections necessary according to Rules 15 and 21a of the Bacteriological Code (1990 Revision), and designation of appropriate nomenclatural types of classes and subclasses. Request for an opinion. *Int J Syst Evol Microbiol.* **51**(Pt 2):725-7.
68. **Exterkate, F. A., Veerkamp, J.H.** 1969. Biochemical changes in *Bifidobacterium bifidum* var. *pennsylvanicus* after cell wall inhibition. Composition of lipids. *Biochem. Biophys. Acta* **176** (1): 65-77.
69. **Falk P, Hoskins LC, Larson G.** 1990. Bacteria of the human intestinal microbiota produce glycosidases specific for lacto-series glycosphingolipids. *J Biochem (Tokyo).* **108**(3):466-74.
70. **Farr SB, Kogoma T.** 1991. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol Rev.* **55**(4):561-85.
71. **Feldheim DA, Chin AM, Nierva CT, Feucht BU, Cao YW, Xu YF, Sutrina SL, Saier MH Jr.** 1990. Physiological consequences of the complete loss of phosphoryl-transfer proteins HPr and FPr of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system and analysis of fructose (*fru*) operon expression in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol.* **172**(9):5459-69.
72. **Fennington GJ Jr, Hughes TA.** 1996. The fructokinase from *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* belongs to group I fructokinase enzymes and is encoded separately from other carbohydrate metabolism enzymes. *Microbiology.* **142** (Pt 2):321-30.
73. **Finegold SM, George WL, Mulligan ME.** 1985. Anaerobic infections. *Dis Mon.* **31**(11):1-97.
74. **Fischer, W.** 1987. Lipoteichoic acid of *Bifidobacterium bifidum* subspecies *pennsylvanicum* DSM 20239. A lipoglucon with monoglycerophosphate side chain. *Eur. J. Biochem.* **165** : 639-646.
75. **Fischer, W., Bauer, W. and Feigel, M.** 1987. Analysis of the lipoteichoic acid-like macroamphiphile from *Bifidobacterium bifidum* subspecies *pennsylvanicum* by one- and two dimensional ¹H- and ¹³C-NMR spectroscopy. *Eur. J. Biochem.* **165** : 647-652.
76. **Frank, H. A., Skinner, C. E.** 1954. The relationship between *Actinomyces bovis* and *Lactobacillus bifidus*. *Mycologia.* **46**: 728-735.
77. **Franks AH, Harmsen HJ, Raangs GC, Jansen GJ, Schut F, Welling GW.** 1998. Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent *in situ*

- hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol.* **64**(9):3336-45.
78. **Fridovich I.** 1978. The biology of oxygen radicals. *Science.* **201**(4359):875-80.
79. **Gardner A, Davies HV, Burch LR.** 1992. Purification and properties of fructokinase from developing tubers of potato (*Solanum tuberosum*). *Plant Physiol* **100**: 178-183.
80. **Gardner PR, Fridovich I.** 1991. Superoxide sensitivity of the *Escherichia coli* aconitase. *J Biol Chem.* **266**(29):19328-33.
81. **Gaskins HR, Vondrak-Juergens GL, McCracken BA, Woolsey JH.** 1997. Specific-pathogen-free conditions enhance inflammatory bowel disease in T-cell receptor knockout, but not C3H/HeJBir mice. *Lab Anim Sci.* **47**(6):650-5.
82. **Gasser, F., and M. Mandel.** 1968. Deoxyribonucleic acid base composition of the genus *Lactobacillus*. *J. Bacteriol.* **96**:580-588
83. **Gavini F, Pourcher AM, Neut C, Monget D, Romond C, Oger C, Izard D.** 1991. Phenotypic differentiation of bifidobacteria of human and animal origins. *Int J Syst Bacteriol.* **41**(4):548-57.
84. **Geerse RH, Izzo F, Postma PW.** 1989. The PEP: fructose phosphotransferase system in *Salmonella typhimurium*: FPr combines enzyme III Fru and pseudo-HPr activities. *Mol Gen Genet.* **216**(2-3):517-25.
85. **Gibson GR, Wang X.** 1994. Enrichment of bifidobacteria from human gut contents by oligofructose using continuous culture. *FEMS Microbiol Lett.* **118**(1-2):121-7.
86. **Gibson GR, Wang X.** 1994. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *J Appl Bacteriol.* **77**(4):412-20.
87. **Gibson GR.** 1999. Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin. *J Nutr.* **129**(7 Suppl):1438S-41S.
88. **Gish W, States DJ.** 1993. Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nat Genet.* **3**(3):266-72.
89. **Glick, M.C., Sall, T., Zilliken, F., Mudd, F.** 1960. Morphological changes of *Lactobacillus bididus* var. *pennsylvanicus* produced by a cell wall precursor. *Biochem. Biophys. Acta* **37** (2): 361-363.
90. **Gold DV, Shochat D.** 1989. Studies on the structure of the organ-specific determinant of human colonic mucin. *Mol Immunol.* **26**(8):769-77.

-
91. **Gonzali S, Pistelli L, De Bellis L, Alpi A.** 2001. Characterization of two *Arabidopsis thaliana* fructokinases. *Plant Sci.* **160**(6):1107-1114.
92. **Gopal-Srivastava R, Hylemon PB.** 1998. Purification and characterization of bile salt hydrolase from *Clostridium perfringens*. *J Lipid Res.* **29**(8):1079-85.
93. **Gopal-Srivastava R, Mallonee DH, White WB, Hylemon PB.** 1990. Multiple copies of a bile acid-inducible gene in *Eubacterium* sp. strain VPI 12708. *J Bacteriol.* **172**(8):4420-6.
94. **Gorbach, S. L, A. G. Plaut, L. Nahas, L. Weinstein, G. Spanknebel, and R. Levitan.** 1967. Studies of intestinal microflora. II. Microorganisms of the small intestine and their relations to oral and fecal flora. *Gastroenterology* **53**:856-867
95. **Grill JP, Crociani J, Ballongue J.** 1995. Characterization of fructose 6 phosphate phosphoketolases purified from *Bifidobacterium* species. *Curr Microbiol.* **31**(1):49-54.
96. **Grill JP, Manginot-Durr C, Schneider F, Ballongue J.** 1995. Bifidobacteria and probiotic effects: action of *Bifidobacterium* species on conjugated bile salts. *Curr Microbiol.* **31**(1):23-7.
97. **Grohmann E, Muth G, Espinosa M.** 2003. Conjugative plasmid transfer in gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* **67**(2):277-301.
98. **Gyllenberg, H. G.** 1955. The development of the « straight rod type » of *Lactobacillus bifidus*. *J. Gen. Microbiol.* **13**(2): 394-396.
99. **Habu Y, Nagaoka M, Yokokura T, Azuma I.** 1987. Structural studies of cell wall polysaccharides from *Bifidobacterium breve* YIT 4010 and related *Bifidobacterium* species. *J Biochem* (Tokyo). **102**(6):1423-32.
100. **Hall B. G. ; Yokoyama, S ; Calhoun, D. H.** 1983. Role of cryptic genes in microbial evolution. *Mol.Biol. Evol* **1** : 109-124.
101. **Hanes, C.S.** 1932. Studies on plant amylases. *Biochem. J.* **26** :1406-1421.
102. **Harmsen HJ, Raangs GC, He T, Degener JE, Welling GW.** 2002. Extensive set of 16S rRNA-based probes for detection of bacteria in human feces. *Appl Environ Microbiol.* **68**(6):2982-90.
103. **Hassinen, J.B., Durbin, G.T., Bernhart, F.W.** 1951. The bacteriostatic effects of saturated fatty acids. *Archives de Biochimie et Biophysique*, **31**, 183 189.
104. **Henrick K, Collyer CA, Blow DM.** 1989. Structures of D-xylose isomerase from *Arthrobacter* strain B3728 containing the inhibitors xylitol and D-sorbitol at 2.5 Å and 2.3 Å resolution, respectively. *J Mol Biol.* **208**(1):129-57.

105. **Hidaka H., Eida T., Takizawa T., Tokunaga T., Tashiro Y.** 1986. Effects of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health. *Bifidobacteria and Microflora*, **5**: 37-50.
106. **Hill, MJ.** 1995. The normal gut bacterial flora. In: Hill MJ (Ed). Role of Gut Bacteria in Human Toxicology and Pharmacology. Taylor & Francis, London, pp :3-17
107. **Hoffmann Ê, Mossel DAA, Korus W, van de Kamer J.** 1964. Untersuchungen uber die Wirkungsweise der Lactulose. *Klin Wochenschr* **42**: 126-130.
108. **Holzappel, W., Scardovi, V., Kandler, O.** 1969. The amino acid sequence of the ornitine- and lysine-containing mureins of some strains of *Lactobacillus bifidus* isolated from the rumen. *Z. Naturforsch.* **24 B** (12): 1524-1528.
109. **Hopkins MJ, Macfarlane GT.** 2002. Changes in predominant bacterial populations in human faeces with age and with *Clostridium difficile* infection. *J Med Microbiol.* **51**(5):448-54.
110. **Hopkins MJ, Sharp R, Macfarlane GT.** 2002. Variation in human intestinal microbiota with age. *Dig Liver Dis.* **34** Suppl 2:S12-8.
111. **Hoskins LC.** 1981. Human enteric population ecology and degradation of gut mucins. *Dig Dis Sci.* **26**(9):769-72.
112. **Hoskins LC, Boulding ET.** 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**(1):163-72.
113. **Hoskins LC, Agustines M, McKee WB, Boulding ET, Kriaris M, Niedermeyer G.** 1985. Mucin degradation in human colon ecosystems. Isolation and properties of fecal strains that degrade ABH blood group antigens and oligosaccharides from mucin glycoproteins. *J Clin Invest.* **75**(3):944-53.
114. **Hounsell EF, Lawson AM, Feizi T.** 1982. Structural and antigenic diversity in mucin carbohydrate chains. *Adv Exp Med Biol.* **144**:39-41.
115. **Hounsell EF, Feizi T.** 1982. Gastrointestinal mucins. Structures and antigenicities of their carbohydrate chains in health and disease. *Med Biol.* **60**(5):227-36.
116. **Hounsell EF, Davies MJ, Renouf DV.** 1996. O-linked protein glycosylation structure and function. *Glycoconj J.* **13**(1):19-26.

-
117. **Hoyles L, Ingnas E, Falsen E, Drancourt M, Weiss N, McCartney AL, Collins MD.** 2002. *Bifidobacterium scardovii* sp. nov., from human sources. *Int J Syst Evol Microbiol.* **52**(Pt 3):995-9.
118. **Hung MN, Xia Z, Hu NT, Lee BH.** 2001. Molecular and biochemical analysis of two beta-galactosidases from *Bifidobacterium infantis* HL96. *Appl Environ Microbiol.* **67**(9):4256-63.
119. **Hung MN, Lee BH.** 2002. Purification and characterization of a recombinant beta-galactosidase with transgalactosylation activity from *Bifidobacterium infantis* HL96. *Appl Microbiol Biotechnol.* **58**(4):439-45.
120. **Husain, I., Poupard, J.A., Norris, R.F.** 1972. Influence of nutrition on the morphology of a strain of *Bifidobacterium bifidum*. *J. Bact.* **111**: 841-844.
121. **Imamura L, Hisamitsu K, Kobashi K.** 1994. Purification and characterization of beta-fructofuranosidase from *Bifidobacterium infantis*. *Biol Pharm Bull.* **17**(5):596-602.
122. **Imlay JA, Chin SM, Linn S.** 1988. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science.* **240**(4852):640-2.
123. **Imlay JA, Linn S.** 1988. DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science.* **240**(4857):1302-9.
124. **Iwata S, Minowa T, Mikami B, Morita Y, Ohta T.** 1989. Crystallization of and preliminary crystallographic data for allosteric L-lactate dehydrogenase from *Bifidobacterium longum*. *J Biochem (Tokyo).* **106**(4):558-9.
125. **Iwasaki H, Araki Y, Ito E, Nagaoka M, Yokokura T.** 1990. Structure of macroamphiphiles from several *Bifidobacterium* strains. *J Bacteriol.* **172**(2):845-52.
126. **Ji, G.E., Park, M.S. and Shin, D.W.** 1999. Sequence analysis of pKJ36 from *Bifidobacterium longum*. Direct Submission [AF139129](#).
127. **Jian W, Zhu L, Dong X.** 2001. New approach to phylogenetic analysis of the genus *Bifidobacterium* based on partial HSP60 gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol.* **51**(Pt 5):1633-8.
128. **Jian W, Dong X.** 2002. Transfer of *Bifidobacterium inopinatum* and *Bifidobacterium denticolens* to *Scardovia inopinata* gen. nov., comb. nov., and *Parascardovia denticolens* gen. nov., comb. nov., respectively. *Int J Syst Evol Microbiol.* **52**(Pt 3):809-12.
129. **Jiang H, Dian W, Liu F, Wu P.** 2003. Isolation and characterization of two fructokinase cDNA clones from rice. *Phytochemistry.* **62**(1):47-52.

-
130. **de Jonge BL, Gage D, Handwerger S.** 1996. Peptidoglycan composition of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Microb Drug Resist.* **2**(2):225-9.
131. **Kaiser** 2001. [Doc Kaiser's Microbiology Home Page](http://www.cat.cc.md.us/courses/bio141/lecguide/unit1/prostruct/cw.html)
<http://www.cat.cc.md.us/courses/bio141/lecguide/unit1/prostruct/cw.html>
132. **Kabat EA, Bassett EW, Pryzwansky K, Lloyd KO, Kaplan ME, Layug EJ.** 1965. Immunochemical studies on blood groups. XXXIII. The effects of alkaline borohydride and of alkali on blood group A, B, and H substances. *Biochemistry.* **4**(8):1632-8.
133. **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.
134. **Kandler O, Lauer E.** 1974. New concepts in taxonomy of bifidobacteria *Zentralbl Bakteriol* [Orig A]. **228**(1):29-45.
135. **Kaneko T, Saito K, Kawamura Y, Takahashi S.** 2001. Molecular cloning of acid-stable glucose isomerase gene from *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 by a simple two-step PCR method, and its expression in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem.* **65**(5):1054-62.
136. **Kaufmann P, Pfefferkorn A, Teuber M, Meile L.** 1997. Identification and quantification of *Bifidobacterium* species isolated from food with genus-specific 16S rRNA-targeted probes by colony hybridization and PCR. *Appl Environ Microbiol.* **63**(4):1268-73.
137. **Koch, D., Schleifer, K. H. , Kandler, O.** 1970. The amino acid sequence of the serine and aspartic acid containing mureins of *Bifidobacterium bifidum* Orla Jensen. *Z. Naturforsch.* **25** B (11): 1294-1301.
138. **Kojima, M., Suda, S., Hotta, S., Hamada, K.** 1968. Induction of pleomorphism in *Lactobacillus bifidus*. *J. Bact.* **95** (2): 710-711.
139. **Kojima, M., Suda, S., Hotta, S., Hamada, K.** 1970. Induction of pleomorphism and calcium deficiency in *Lactobacillus bifidus*. *J. Bact.* **102**: 217-220.
140. **Kosono S, Kataoka M, Seki T, Yoshida T.** 1996. The TraB protein, which mediates the intermycelial transfer of the *Streptomyces* plasmid pSN22, has functional NTP-binding motifs and is localized to the cytoplasmic membrane. *Mol Microbiol.* **19**(2):397-405.
141. **Krzewinski F, Brassart C, Gavini F, Bouquelet S.** 1996. Characterization of the lactose transport system in the strain *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082. *Curr Microbiol.* **32**(6):301-7.

-
142. **Krzewinski F, Brassart C, Gavini F, Bouquelet S.** 1997. Glucose and galactose transport in *Bifidobacterium bifidum* DSM 20082. *Curr Microbiol.* **35**(3):175-9.
143. **Kullen, M.J., Brady, L.J. & O'Sullivan, D.J.** 1997. Evaluation of using a short region of the *recA* gene for rapid and sensitive speciation of dominant bifidobacteria in the human large intestine. *FEMS Micro. Letters* **154**, 377-383.
144. **Kunz, C., and S. Rudloff.** 1993. Biological functions of oligosaccharides in human milk. *Acta Paediatr.* **82**:903-912.
145. **Kurenbach B, Bohn C, Prabhu J, Abudukerim M, Szewzyk U, Grohmann E.** 2003. Intergeneric transfer of the *Enterococcus faecalis* plasmid pIP501 to *Escherichia coli* and *Streptomyces lividans* and sequence analysis of its *tra* region. *Plasmid.* **50**(1):86-93.
146. **Lamblin G, Boersma A, Lhermitte M, Roussel P, Mutsaers JH, van Halbeek H, Vliegthart JF.** 1984. Further characterization, by a combined high-performance liquid chromatography/¹H-NMR approach, of the heterogeneity displayed by the neutral carbohydrate chains of human bronchial mucins. *Eur J Biochem.* **143**(1):227-36.
147. **Lamblin G, Rahmoune H, Wieruszkeski JM, Lhermitte M, Strecker G, Roussel P.** 1991. Structure of two sulphated oligosaccharides from respiratory mucins of a patient suffering from cystic fibrosis. A fast-atom-bombardment M.S. and ¹H-n.m.r. spectroscopic study. *Biochem J.* **275** (Pt 1):199-206.
148. **Lambert, R., Saito, Y., Veerkamp, J.H.** 1965. Incorporation of labeled derivatives of 2-deoxy-2-amino-D-glucose into the cell walls of *Lactobacillus bifidus* var. *pennsylvanicus*. *Arch. Biochem; Biophys.* **110**(2): 341-345.
149. **Langendijk PS, Schut F, Jansen GJ, Raangs GC, Kamphuis GR, Wilkinson MH, WellingGW.** 1995. Quantitative fluorescence in situ hybridization of *Bifidobacterium* spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. *Appl Environ Microbiol.* **61**(8):3069-75.
150. **Larson G, Falk P, Hoskins LC.** 1988. Degradation of human intestinal glycosphingolipids by extracellular glycosidases from mucin-degrading bacteria of the human fecal flora. *J Biol Chem.* **263**(22):10790-8.
151. **Lauer E, Kandler O.** 1976. Mechanism of the variation of the acetate/lactate/ratio during glucose fermentation by bifidobacteria. *Arch Microbiol.* **110**(23):271-7.
152. **Lauer, E., and O. Kandler.** 1983. DNA-DNA homology, murein types and enzyme patterns in the type strains of the genus *Bifidobacterium*. *Syst. Appl. Microbiol.* **4**:42-64.

-
153. **Lauer E.** 1990. *Bifidobacterium gallicum* sp. nov. isolated from human feces. *Int J Syst Bacteriol.* **40**(1):100-2.
154. **Leblond-Bourget, N., H Philippe, I Mangin, and B Decaris.** 1996. 16S rRNA and 16S to 23S internal transcribed spacer sequence analyses reveal inter- and intraspecific *Bifidobacterium* phylogeny *Int J Syst Bacteriol* **46**: 102-111.
155. **Leder S, Hartmeier W, Marx SP.** 1999. Alpha-galactosidase of *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083. *Curr Microbiol.* **38**(2):101-6.
156. **Lee LJ, Kimura A, Tochikura T.** 1978. Presence of a single enzyme catalyzing the pyrophosphorolysis of UDP-glucose and UDP-galactose in *Bifidobacterium bifidum*. *Biochim Biophys Acta.* **527**(1):301-4.
157. **Lee L, Kimura A, Tochikura T.** 1979. Purification and properties of UDP-glucose (UDP-galactose) pyrophosphorylase from *Bifidobacterium bifidum*. *J Biochem* (Tokyo). **86**(4):923-8.
158. **Lee,J.H., Halgerson,J.S. and O'Sullivan,D.J.** 2002.Sequence analysis of plasmid pDOJH 10S from *Bifidobacterium longum*. Direct Submission. AF538869.
159. **Liochev SI, Fridovich I.** 1991. The roles of O₂⁻, HO(·), and secondarily derived radicals in oxidation reactions catalyzed by vanadium salts. *Arch Biochem Biophys.* **291** :(2):379-82.
160. **Lim KS, Huh CS, Baek YJ.** 1993. Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria. *J Dairy Sci.* **76**(8):2168-74.
161. **Van Loo J, Cummings J, Delzenne N, Englyst H, Franck A, Hopkins M, Kok N, Macfarlane G, Newton D, Quigley M, Roberfroid M, van Vliet T, van den Heuvel E.** 1999. Functional food properties of non-digestible oligosaccharides: a consensus report from the ENDO project (DGXII AIRII-CT94-1095). *Br J Nutr.* **81**(2):121-32.
162. **Luesink EJ, Marugg JD, Kuipers OP, de Vos WM.** 1999. Characterization of the divergent *sacBK* and *sacAR* operons, involved in sucrose utilization by *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol.* **181**(6):1924-6.
163. **Lundeen SG, Savage DC.** 1992. Multiple forms of bile salt hydrolase from *Lactobacillus* sp. strain 100-100. *J Bacteriol.* **174**(22):7217-20.
164. **Macfadyen LP, Dorocicz IR, Reizer J, Saier MH Jr, Redfield RJ.** 1996. Regulation of competence development and sugar utilization in *Haemophilus influenzae* Rd by a phosphoenolpyruvate:fructose phosphotransferase system. *Mol Microbiol.* **21**(5):941-52.

165. **Macfarlane GT, Englyst HN.** 1986. Starch utilization by the human large intestinal microflora. *J Appl Bacteriol.* **60**(3):195-201.
166. **Macfarlane GT, Cummings JH, Allison C.** 1986. Protein degradation by human intestinal bacteria. *J Gen Microbiol.* **132** (Pt 6):1647-56.
167. **Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR.** 1999. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr.* **69**(5):1035S-1045S.
168. **Mainardi JL, Billot-Klein D, Coutrot A, Legrand R, Schoot B, Gutmann L.** 1998. Resistance to cefotaxime and peptidoglycan composition in *Enterococcus faecalis* are influenced by exogenous sodium chloride. *Microbiology.* **144**(Pt 10):2679-85.
169. **Malyoth, G, Bauer, A.** 1950. Beobachtungen am *Bacterium bifidum*. *Z. Kinderheilk.* **68**: 359-367.
170. **Margolles A, de los Reyes-Gavilan CG.** 2003. Purification and functional characterization of a novel alpha-L-arabinofuranosidase from *Bifidobacterium longum* B667. *Appl Environ Microbiol.* **69**(9):5096-103.
171. **Marounek, M., V. Rada, and V. Benda.** 1998. Biochemical characteristics and fermentation of glucose and starch by rabbit caecal strains of *Bifidobacterium globosum*. *Folia Microbiol.* (Phara) **43**:113-116.
172. **Martinez-Barajas E, Luethy MH, Randall DD.** 1997. Molecular cloning and analysis of fructokinase expression in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Sci* **125**: 1320.
173. **Martinez-Barajas E, Randall DD.** 1996. Purification and characterization of fructokinase from developing tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits. *Planta* **199**: 451458.
174. **Mata, L., J., Carillo, C., Villatoro.** 1969. Faecal microflora in healthy persons in a preindustrial region. *Appl. Microbiol.* **17**: 596-602.
175. **Matteuzzi D, Crociani F, Zani G, Trovatelli LD.** 1971. *Bifidobacterium suis* n. sp.: a new species of the genus *Bifidobacterium* isolated from pig feces. *Z Allg Mikrobiol.* **11**(5):387-95.
176. **Matteuzzi D, Sozzi T.** 1971. *Bifidobacterium* bacteriophage from calf rumen. *Z Allg Mikrobiol.* **11**(1):57-8.
177. **Matteuzzi D, Crociani F, Brigidi P.** 1983. Antimicrobial susceptibility of *Bifidobacterium*. *Ann Microbiol* (Paris). **134A**(3):339-49.

-
178. **Matteuzzi D, Brigidi P, Rossi M, Di D.** 1990. Characterization and molecular cloning of *Bifidobacterium longum* cryptic plasmid pMB1. *Lett Appl Microbiol.* **11**(4):220-3.
179. **Matsuki T, Watanabe K, Tanaka R, Oyaizu H.** 1998. Rapid identification of human intestinal bifidobacteria by 16S rRNA-targeted species- and group-specific primers. *FEMS Microbiol Lett.* **167**(2):113-21.
180. **Matsuki T, Watanabe K, Tanaka R, Fukuda M, Oyaizu H.** 1999. Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA- gene-targeted species-specific primers. *Appl Environ Microbiol.* **65**(10):4506-12.
181. **McCord JM, Day ED Jr.** 1978. Superoxide-dependent production of hydroxyl radical catalyzed by iron-EDTA complex. *FEBS Lett.* **86**(1):139-42.
182. **Medina A, Sols A.** 1956. A specific fructokinase in peas. *Biochim Biophys Acta.* **19**(2):378-9.
183. **Meile L, Rohr LM, Geissmann TA, Herensperger M, Teuber M.** 2001. Characterization of the D-xylulose 5-phosphate/D-fructose 6-phosphate phosphoketolase gene (*xfp*) from *Bifidobacterium lactis*. *J Bacteriol.* **183**(9):2929-36.
184. **Mevissen-Verhage EA, Marcelis JH, de Vos MN, Harmsen-van Amerongen WC, Verhoef J.** 1987. *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, and *Clostridium* spp. in fecal samples from breast-fed and bottle-fed infants with and without iron supplement. *J Clin Microbiol.* **25**(2):285-9.
185. **Miller,** 1972. Experiments in molecular genetics. New York, Cold Spring Harbour Press.
186. **Mitsuoka, T.** 1969. Vergleichende Untersuchungen über Lactobazillen aus den Faeces von Menschen, Schweinen und Hühnern. *Zbl. Bakt. I. Orig.,* **210**; 32-51.
187. **Mitsuoka, T. and Kaneuchi, C.** 1977. Ecology of the bifidobacteria. *Am J Clin Nutr* **30**: 1799-1810.
188. **Mitsuoka, T.** 1982. Recent trends in research on intestinal flora. *Bifidobacteria microflora.* **1** : 3-24.
189. **Muchmore EA, Varki NM, Fukuda M, Varki A.** 1987. Developmental regulation of sialic acid modifications in rat and human colon. *FASEB J.* **1**(3):229-35.
190. **Moller PL, Jorgensen F, Hansen OC, Madsen SM, Stougaard P.** 2001. Intra- and extracellular beta-galactosidases from *Bifidobacterium bifidum* and *B. infantis*: molecular cloning, heterologous expression, and comparative characterization. *Appl Environ Microbiol.* **67**(5):2276-83.

191. **Moreno MS, Schneider BL, Maile RR, Weyler W, Saier MH Jr.** 2001. Catabolite repression mediated by the CcpA protein in *Bacillus subtilis*: novel modes of regulation revealed by whole-genome analyses. *Mol Microbiol.* **39**(5):1366-81.
192. **Mullie C, Odou MF, Singer E, Romond MB, Izard D.** 2003. Multiplex PCR using 16S rRNA gene-targeted primers for the identification of bifidobacteria from human origin. *FEMS Microbiol Lett.* **222**(1):129-36.
193. **Muramatsu, K., Onodera, S., Kikuchi, M. Shiomi, N.** 1992. The production of beta-fructofuranosidase from *Bifidobacterium* spp. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**, 1451–1454.
194. **Muth G, Farr M, Hartmann V, Wohlleben W.** 1995. *Streptomyces ghanaensis* plasmid pSG5: nucleotide sequence analysis of the self-transmissible minimal replicon and characterization of the replication mode. *Plasmid.* **33**(2):113-26.
195. **Muyzer G, Smalla K.** 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **73**(1):127-41.
196. **Nagaoka M, Hashimoto S, Shibata H, Kimura I, Kimura K, Sawada H, Yokokura T.** 1996. Structure of a galactan from cell walls of *Bifidobacterium catenulatum* YIT4016. *Carbohydr Res.* **281**(2):285-91.
197. **Nagaoka M, Shibata H, Kimura I, Hashimoto S, Kimura K, Sawada H, Yokokura T.** 1995. Structural studies on a cell wall polysaccharide from *Bifidobacterium longum* YIT4028. *Carbohydr Res.* **274**:245-9.
198. **Negróni, P., Fischer, I.** 1944. Estudio sobre el *Lactobacillus bifidus* (Tissier) Kulp y Retger. *Rev. Soc. Argent. Biol.* **20**: 313-327.
199. **von Nicolai H, Esser P, Lauer E.** 1981. Partial purification and properties of neuraminidase from *Bifidobacterium lactentis*. Hoppe Seylers *Z Physiol Chem.* **362**(2):153-62.
200. **Norris, R. F., Flanders, T., Tomarelli, R. M. Gyorgy, P.** 1950. The isolation and cultivation of *Lactobacillus bifidus*. A comparison of branched and unbranched strains. *J. Bact.* **60**: 681-696.
201. **Nothhaft H, Parche S, Kamionka A, Titgemeyer F.** 2003. In vivo analysis of HPr reveals a fructose-specific phosphotransferase system that confers high-affinity uptake in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol.* **185**(3):929-37.
202. **Novik, G. I. and V. V. Vysotskii.** 1996. Changes in Cell Morphology during the Developmental Cycle of *Bifidobacterium adolescentis* and *Bifidobacterium bifidum*. *Populations.Microbiology.* **65**(1) :52-62.

203. **Novik, G. I. and V. V. Vysotskii.** 1996. Cell Reproduction and Differentiation in the Development Cycle of *Bifidobacterium adolescentis* and *Bifidobacterium bifidum* Populations. *Microbiology*. Vol. **65**, No. 3 : 314-320.
204. **Nunoura N, Ohdan K, Yano T, Yamamoto K, Kumagai H.** 1996. Purification and characterization of beta-D-glucosidase (beta-D-fucosidase) from *Bifidobacterium breve* clb acclimated to cellobiose. *Biosci Biotechnol Biochem.* **60**(2):188-93.
205. **Nunoura N, Ohdan K, Tanaka K, Tamaki H, Yano T, Inui M, Yukawa H, Yamamoto K, Kumagai H.** 1996. Cloning and nucleotide sequence of the beta-D-glucosidase gene from *Bifidobacterium breve* clb, and expression of beta-D-glucosidase activity in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem.* **60**(12):2011-8.
206. **Nunoura, N, Fujita T, Ohdan K, Kirihata M, Yamamoto K, Kumagai H.** 1997. Structural analysis of disaccharides synthesized by beta-D-glucosidase of *Bifidobacterium breve* clb and their assimilation by Bifidobacteria. *Biosci Biotechnol Biochem.* **61**(6):1033-5.
207. **O'Brien, P.,J., Glick, M., C., Zilliken, F.** 1960. Acid aminosugars from bacteria. Incorporation of (1-¹⁴C)-alpha, beta-methyl-N-acetyl-D-glucosaminide into muramic acid. *Biochem. Biophys. Acta.* **37**: 357-360.
208. **Op den Camp HJ, Veerkamp JH, Oosterhof A, Van Halbeek H.** 1984. Structure of the lipoteichoic acids from *Bifidobacterium bifidum* spp. *pennsylvanicum*. *Biochim Biophys Acta.* **795**(2):301-13.
209. **O'Riordan K, Fitzgerald GF.** 1997. Determination of genetic diversity within the genus *Bifidobacterium* and estimation of chromosomal size. *FEMS Microbiol Lett.* **156**(2):259-64.
210. **O'Riordan K, Fitzgerald GF.** 1999. Molecular characterisation of a 5.75-kb cryptic plasmid from *Bifidobacterium breve* NCFB 2258 and determination of mode of replication. *FEMS Microbiol Lett.* **174** (2):285-94.
211. **Orla-Jensen, S.** 1924. La classification des des bactéries lactiques. *Lait* **4**, 468-474.
212. **Ouwehand, A. C., P. V. Kirjavainen, M.-M. Grönlund, E. Isolauri, and S. J. Salminen.** 1999. Adhesion of probiotic microorganisms to intestinal mucus. *Int. Dairy J.* **9**:623-630.
213. **Parche S, Schmid R, Titgemeyer F.** 1999. The phosphotransferase system (PTS) of *Streptomyces coelicolor* identification and biochemical analysis of a histidine phosphocarrier protein HPr encoded by the gene *ptsH*. *Eur J Biochem.* **265**(1):308-17.

-
214. **Parche S, Nothhaft H, Kamionka A, Titgemeyer F.** 2000. Sugar uptake and utilisation in *Streptomyces coelicolor*: a PTS view to the genome. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **78**(3-4):243-51.
215. **Park MS, Lee KH, Ji GE.** 1997. Isolation and characterization of two plasmids from *Bifidobacterium longum*. *Lett Appl Microbiol.* **25**(1):5-7.
216. **Park MS, Shin DW, Lee KH, Ji GE.** 1999. Sequence analysis of plasmid pKJ50 from *Bifidobacterium longum*. *Microbiology.* **145** (Pt 3):585-92.
217. **Pelmont, J.** 1989. Enzymes. Presse universitaire de Grenoble. Chapitre 11.
218. **Perrin S, Warchol M, Grill JP, Schneider F.** 2001. Fermentations of fructo-oligosaccharides and their components by *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697 on batch culture in semi-synthetic medium. *J Appl Microbiol.* **90**(6):859-65.
219. **Porter EV, Chassy BM, Holmlund CE.** 1980. Partial purification and properties of a mannofructokinase from *Streptococcus mutans* SL-1. *Infect Immun.* **30**(1):43-50.
220. **Postma PW, Lengeler JW, Jacobson GR.** 1993. Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev.* **57**(3):543-94.
221. **Poupard JA, Husain I, Norris RF.** 1973. Biology of the bifidobacteria. *Bacteriol Rev.* **37**(2):136-65.
222. **Priebe MG, Vonk RJ, Sun X, He T, Harmsen HJ, Welling GW.** 2002. The physiology of colonic metabolism. Possibilities for interventions with pre- and probiotics. *Eur J Nutr.* **41** Suppl 1:12-10.
223. **Radman M, Taddei F, Matic I.** 2000. Evolution-driving genes. *Res Microbiol.* **151**(2):91-5.
224. **Reizer J, Hoischen C, Titgemeyer F, Rivolta C, Rabus R, Stulke J, Karamata D, Saier MH Jr, Hillen W.** 1998. A novel protein kinase that controls carbon catabolite repression in bacteria. *Mol Microbiol.* **27**(6):1157-69.
225. **Requena T, Burton J, Matsuki T, Munro K, Simon MA, Tanaka R, Watanabe K, Tannock GW.** 2000. Identification, detection, and enumeration of human bifidobacterium species by PCR targeting the transaldolase gene. *Appl Environ Microbiol.* **68**(5):2420-7.
226. **Reid SJ, Rafudeen MS, Leat NG.** 1999. The genes controlling sucrose utilization in *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 constitute an operon. *Microbiology.* **145** (Pt 6):1461-72.

-
227. **Renz A, Stitt M.** 1993. Substrate specificity and product inhibition of different forms of fructokinases and hexokinases in developing potato tubers. *Planta* **190**: 166-175.
228. **Reuter, G.** 1963. Comparative studies on the bifidus flora in the feces of infants and adults with a contribution to classification and nomenclature of bifidus strains. *Zentralbl Bakteriol* **191**:486-507.
229. **Reuter G.** 2001. The *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* microflora of the human intestine: composition and succession. *Curr Issues Intest Microbiol.* **2**(2):43-53.
230. **Rocha ER, Smith CJ.** 1998. Characterization of a peroxide-resistant mutant of the anaerobic bacterium *Bacteroides fragilis*. *J Bacteriol.* **180**(22):5906-12.
231. **Robrish SA, Oliver C, Thompson J.** 1991. Sugar metabolism by fusobacteria: regulation of transport, phosphorylation, and polymer formation by *Fusobacterium mortiferum* ATCC 25557. *Infect Immun.* **59**(12):4547-54.
232. **Rogers, H.J., Perkins, H.R., Ward, J. B.** 1980. Microbial Cell Walls & Membranes. Kluwer Academic Publishers.
233. **Romeo T.** 1998. Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. *Mol Microbiol.* **29**(6):1321-30.
234. **Rossi M, Brigidi P, Gonzalez Vara y Rodriguez A, Matteuzzi D.** 1996. Characterization of the plasmid pMB1 from *Bifidobacterium longum* and its use for shuttle vector construction. *Res Microbiol.* **147**(3):133-43.
235. **Rossi M, Brigidi P, Matteuzzi D.** 1998. Improved cloning vectors for *Bifidobacterium* spp. *Lett Appl Microbiol.* **26**(2):101-4.
236. **Rossi M, Altomare L, Gonzalez Vara y Rodriguez A, Brigidi P, Matteuzzi D.** 2000. Nucleotide sequence, expression and transcriptional analysis of the *Bifidobacterium longum* MB 219 *lacZ* gene. *Arch Microbiol.* **174**(1-2):74-80.
237. **Sabater B, Sebastian J, Asensio C.** 1972. Identification and properties of an inducible mannokinase from *Streptomyces violaceoruber*. *Biochim Biophys Acta.* **284**(2):406-13.
238. **Sabater B, Asensio C.** 1973. Fructose determination with a specific fructokinase. *Anal Biochem.* **54**(1):205-12.
239. **Sabater B, Delafuente G.** 1975. Kinetic properties and related changes of molecular weight in a fructokinase from *Streptomyces violaceoruber*. *Biochim Biophys Acta.* **377**(2):258-70.

240. **Sakata S, Kitahara M, Sakamoto M, Hayashi H, Fukuyama M, Benno Y.** 2002. Unification of *Bifidobacterium infantis* and *Bifidobacterium suis* as *Bifidobacterium longum*. *Int J Syst Evol Microbiol.* **52**(Pt 6):1945-51.
241. **Salyers AA, Vercellotti JR, West SE, Wilkins TD.** 1977. Fermentation of mucin and plant polysaccharides by strains of *Bacteroides* from the human colon. *Appl Environ Microbiol.* **33**(2):319-22.
242. **Salyers AA, West SE, Vercellotti JR, Wilkins TD.** 1977. Fermentation of mucins and plant polysaccharides by anaerobic bacteria from the human colon. *Appl Environ Microbiol.* **34**(5):529-33.
243. **Saier MH Jr, Ramseier TM.** 1996. The catabolite repressor/activator (Cra) protein of enteric bacteria. *J Bacteriol.* **178**(12):3411-7.
244. **Saier MH Jr.** 1996. Regulatory interactions controlling carbon metabolism: an overview. *Res Microbiol.* **147**(6-7):439-47.
245. **Saier MH Jr, Crasnier M.** 1996. Inducer exclusion and the regulation of sugar transport. *Res Microbiol.* **147**(6-7):482-9.
246. **Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T.** 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, Vol. 1, 2, 3.
247. **Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology.* **24**:104-8.
248. **Sato Y, Yamamoto Y, Kizaki H, Kuramitsu HK.** 1993. Isolation, characterization and sequence analysis of the *scrK* gene encoding fructokinase of *Streptococcus mutans*. *J Gen Microbiol.* **139** (Pt 5):921-7.
249. **Satokari RM, Vaughan EE, Akkermans AD, Saarela M, De Vos WM.** 2001. Polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis monitoring of fecal bifidobacterium populations in a prebiotic and probiotic feeding trial. *Syst Appl Microbiol.* **24**(2):227-31.
250. **Satokari RM, Vaughan EE, Akkermans AD, Saarela M, de Vos WM.** 2001. Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol.* **67**(2):504-13.
251. **Savage D. C.** 1977. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Ann. Rev. Microbiol.* **31** : 107-133.
252. **Scardovi, V., Trovatelli, L. D.** 1965. The fructose-6-phosphate shunt as a peculiar pattern of hexose degradation in the genus *Bifidobacterium*. *Ann. Microbiol. Enzymol.* **15**: 19-29.

253. **Scardovi V., Trovatelli L.D., Crociani F. and Sgorbati B.** 1969. Bifidobacteria in bovine rumen. New species of the genus *Bifidobacterium*: *B. globosum* n. sp. and *B. ruminale* n. sp. *Arch. Microbiol.*, **68**:278-294.
254. **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. Bakteriол. Parasitenkd. Infektionskr. Abt. 2*, **123**:64-88.
255. **Scardovi V, Zani G, Trovatelli LD.** 1970. Deoxyribonucleic acid homology among the species of the genus *Bifidobacterium* isolated from animals. *Arch Mikrobiol.* **72**(4):318-25.
256. **Scardovi V, Sgorbati B, Zani G.** 1971. Starch gel electrophoresis of fructose-6-phosphate phosphoketolase in the genus *Bifidobacterium*. *J Bacteriol.* **106**(3):1036-9.
257. **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.
258. **Scardovi V. and Zani G.** 1974. *Bifidobacterium magnum* sp. nov., a large acidophilic *Bifidobacterium* isolated from rabbit faeces. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **24**:29-34.
259. **Scardovi V. Trovatelli L.D., Biavati B. and Zani G.** 1979. *Bifidobacterium cuniculi*, *Bifidobacterium choerinum*, *Bifidobacterium boum*, and *Bifidobacterium pseudocatenulatum*: four new species and their deoxyribonucleic acid homology relationships. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **29**:291-311.
260. **Scardovi, V.** 1986. Genus *Bifidobacterium*. In: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG, Eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2*: 1418-1434. Williams & Wilkins, Baltimore.
261. **Schell MA, Karmirantzou M, Snel B, Vilanova D, Berger B, Pessi G, Zwahlen MC, Desiere F, Bork P, Delley M, Pridmore RD, Arigoni F.** 2002. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**(22):14422-7. Epub 2002 Oct 15.
262. **Sebald, M., Gasser, F., Werner, H.** 1965. DNA base composition and classification. Application to the group of bifidobacteria and related genera. *Ann. Instit. Pasteur, Paris.* **109** (2): 251-269.
263. **Sebastian J, Asensio C.** 1972. Purification and properties of the mannokinase from *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys.* **151**(1):227-33.
264. **Severin, A. and Tomasz, A.** 1996. Naturally occurring peptidoglycan variants of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.*, **178**(1) :168-174.

265. **Sgorbati B, Lenaz G, Casalicchio F.** 1976. Purification and properties of two fructose-6-phosphate phosphoketolases in *Bifidobacterium*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **42**(1-2):49-57.
266. **Sgorbati B, Scardovi V, Leblanc DJ.** 1982. Plasmids in the genus *Bifidobacterium*. *J Gen Microbiol*. **128** (Pt 9):2121-31.
267. **Sgorbati B, Smiley MB, Sozzi T.** 1983. Plasmids and phages in *Bifidobacterium longum*. *Microbiologica*. **6**(2):169-73.
268. **Sgorbati B, Scardovi V, Leblanc DJ.** 1986. Related structures in the plasmid profiles of *Bifidobacterium asteroides*, *B. indicum* and *B. globosum*. *Microbiologica*. **9**(4):443-54.
269. **Shin HY, Lee JH, Lee JY, Han YO, Han MJ, Kim DH.** 2003. Purification and characterization of ginsenoside Ra-hydrolyzing beta-D-xylosidase from *Bifidobacterium breve* K-110, a human intestinal anaerobic bacterium. *Biol Pharm Bull*. **26**(8):1170-3.
270. **Shimamura S, Abe F, Ishibashi N, Miyakawa H, Yaeshima T, Araya T, Tomita M.** 1992. Relationship between oxygen sensitivity and oxygen metabolism of *Bifidobacterium* species. *J Dairy Sci*. **75**(12):3296-306.
271. **Shin HY, Park SY, Sung JH, Kim DH.** 2003. Purification and characterization of alpha-L-arabinopyranosidase and alpha-L-arabinofuranosidase from *Bifidobacterium breve* K-110, a human intestinal anaerobic bacterium metabolizing ginsenoside Rb2 and Rc. *Appl Environ Microbiol*. **69**(12):7116-23.
272. **Simpson PJ, Stanton C, Fitzgerald GF, Ross RP.** 2003. Genomic diversity and relatedness of bifidobacteria isolated from a porcine cecum. *J Bacteriol*. **185**(8):2571-81.
273. **Skerman (V.B.D.), McGowan (V.) and Sneath (P.H.A.)** (editors). 1980. Approved Lists of Bacterial Names. *Int. J. Syst. Bacteriol*. **30**, 225-420.
274. **Smeianov, V.V., Efimov, B.A., Korschunov, V.M. and Steele, J.L.** 1999. Construction of *Escherichia coli*-*Bifidobacterium* shuttle vectors based on two distinctive *Bifidobacterium* replicons [NC_004443](#).
275. **del Solar G, Moscoso M, Espinosa M.** 1993. Rolling circle-replicating plasmids from gram-positive and gram-negative bacteria: a wall falls. *Mol Microbiol*. **8**(5):789-96.
276. **Southern, E.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel-electrophoresis. *J Mol Biol*, **98**:503, 1975.

-
277. **Stark, P.L. et Lee, A.** 1982. The microbial ecology of the large bowel of breast-fed and formula-fed infants during the first year of life. *J. Med. Microbiol.* (2): 189-203.
278. **Stellwag EJ, Hylemon PB.** 1976. Purification and characterization of bile salt hydrolase from *Bacteroides fragilis* subsp. *fragilis*. *Biochim Biophys Acta.* **452**(1):165-76.
279. **Storz G, Tartaglia LA, Farr SB, Ames BN.** 1990. Bacterial defenses against oxidative stress. *Trends Genet.* **6**(11):363-8.
280. **Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW.** 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods in Enzymol.* **185**, 60-89.
281. **Sutherland, I. W.** 1972. Bacterial exocellular polysaccharides. Pages 143–213 en *Advances in Microbial Physiology*. A. H. Rose and D. W. Tempest, eds. *Academic Press*. New York.
282. **Taddei F, Matic I, Radman M.** 1995. cAMP-dependent SOS induction and mutagenesis in resting bacterial populations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**(25):11736-40.
283. **Tanaka H, Hashiba H, Kok J, Mierau I.** 2000. Bile salt hydrolase of *Bifidobacterium longum*-biochemical and genetic characterization. *Appl Environ Microbiol.* **66**(6):2502-12.
284. **Tannock GW, McConnell MA, Fuller R.** 1992. A note on the use of a plasmid as a DNA probe in the detection of a *Lactobacillus fermentum* strain in porcine stomach contents. *J Appl Bacteriol.* **73**(1):60-2.
285. **Tannock GW, Tangerman A, Van Schaik A, McConnell MA.** 1994. Deconjugation of bile acids by lactobacilli in the mouse small bowel. *Appl Environ Microbiol.* **60**(9):3419-20.
286. **Tissier, H.** 1900. Recherches sur la flore intestinale des nourrissons (etat normal et pathologique). Paris Thèses: 1-253.
287. **Tissier, H.** 1906. Traitement des infections intestinales par la méthode de la flore bactérienne de l'intestin. *Critical Reviews of the Society for Biology* **60**:359-361.
288. **Titgemeyer F, Walkenhorst J, Reizer J, Stuiver MH, Cui X, Saier MH Jr.** 1995. Identification and characterization of phosphoenolpyruvate: fructose phosphotransferase systems in three *Streptomyces* species. *Microbiology.* **141** (Pt 1):51-8.

-
289. **Thompson J, Chassy BM.** 1981. Uptake and metabolism of sucrose by *Streptococcus lactis*. *J Bacteriol.* **147**(2):543-51.
290. **Thompson J, Sackett DL, Donkersloot JA.** 1991. Purification and properties of fructokinase I from *Lactococcus lactis*. Localization of *scrK* on the sucrose-nisin transposon Tn5306. *J Biol Chem.* **266**(33):22626-33.
291. **Tone-Shimokawa Y, Toida T, Kawashima T.** 1996. Isolation and structural analysis of polysaccharide containing galactofuranose from the cell walls of *Bifidobacterium infantis*. *J Bacteriol.* **178**(1):317-20.
292. **Trindade MI, Abratt VR, Reid SJ.** 2003. Induction of sucrose utilization genes from *Bifidobacterium lactis* by sucrose and raffinose. *Appl Environ Microbiol.* **69**(1):24-32.
293. **Trovatelli L.D., Crociani F., Pedinotti M. and Scardovi V.** 1974. *Bifidobacterium pullorum* sp. nov.: a new species isolated from chicken faeces and a related group of bifidobacteria isolated from rabbit faeces. *Arch. Microbiol.*, **98**:187-198.
294. **Uesugi I, Yajima M.** 1978. Oxygen and "strictly anaerobic" intestinal bacteria. I. Effects of dissolved oxygen on growth. *Z Allg Mikrobiol.* **18** (4):287-95.
295. **Uesugi I, Yajima M.** 1978. Oxygen and "strictly anaerobic" intestinal bacteria. II. Oxygen metabolism in strictly anaerobic bacteria. *Z Allg Mikrobiol.* **18**(8):593-601.
296. **Vandamme, E.J. et Derycke, D.J.** 1983. Microbial inulinases. Fermentation process, properties and application. *Adv. Appl. Microbiol.* **29**: 139-176.
297. **Vangrype W, Ampe C, Kersters-Hilderson H, Tempst P.** 1989. Single active-site histidine in D-xylose isomerase from *Streptomyces violaceoruber*. Identification by chemical derivatization and peptide mapping. *Biochem J.* **263**(1):195-9.
298. **Van Laere KM, Beldman G, Voragen AG.** 1977. A new arabinofuranohydrolase from *Bifidobacterium adolescentis* able to remove arabinosyl residues from double-substituted xylose units in arabinoxylan. *Appl Microbiol Biotechnol.* **47**(3):231-5.
299. **Van Laere KM, Hartemink R, Beldman G, Pitson S, Dijkema C, Schols HA, Voragen AG.** 1999. Transglycosidase activity of *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083 alpha-galactosidase. *Appl Microbiol Biotechnol.* **52**(5):681-8.
300. **Van Laere KM, Abee T, Schols HA, Beldman G, Voragen AG.** 2000. Characterization of a novel beta-galactosidase from *Bifidobacterium adolescentis*

- DSM 20083 active towards transgalactooligosaccharides. *Appl Environ Microbiol.* **66**(4):1379-84.
301. **Van Laere KM, Hartemink R, Bosveld M, Schols HA, Voragen AG.** 2000. Fermentation of plant cell wall derived polysaccharides and their corresponding oligosaccharides by intestinal bacteria. *J Agric Food Chem.* **48**(5):1644-52.
302. **Veerkamp JH.** 1969. Catabolism of glucose and derivatives of 2-deoxy-2-amino-glucose in *Bifidobacterium bifidum* var. *pennsylvanicus*. *Arch Biochem Biophys.* **129**(1):257-63.
303. **Veerkamp JH, van Schaik FW.** 1974. Biochemical changes in *Bifidobacterium bifidum* var. *pennsylvanicus* after cell wall inhibition. VII. Structure of the phosphogalactolipids. *Biochim Biophys Acta.* **348**(3):370-87.
304. **Veerkamp, J. H., Hoelen, J. M. and Op den Camp, H. J. M.** 1983. The structure of the mannitol teichoic acid from *Bifidobacterium bifidum* var. *pennsylvanicus*. *Biochim Biophys Acta.* **755** : 439-451.
305. **Ventura M, Elli M, Reniero R, Zink R.** 2001. Molecular microbial analysis of *Bifidobacterium* isolates from different environments by the species-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiol Ecol.* **36** (2-3):113-121.
306. **Ventura M, Reniero R, Zink R.** 2001. Specific identification and targeted characterization of *Bifidobacterium lactis* from different environmental isolates by a combined multiplex-PCR approach. *Appl Environ Microbiol.* **67**(6):2760-5.
307. **Ventura M, Zink R.** 2002. Rapid identification, differentiation, and proposed new taxonomic classification of *Bifidobacterium lactis*. *Appl Environ Microbiol.* **68**(12):6429-34.
308. **Ventura M, Meylan V, Zink R.** 2003. Identification and tracing of *Bifidobacterium* species by use of enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences. *Appl Environ Microbiol.* **69**(7):4296-301.
309. **Ventura M, Canchaya C, Meylan V, Klaenhammer TR, Zink R.** 2003. Analysis, characterization, and loci of the *tuf* genes in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species and their direct application for species identification. *Appl Environ Microbiol.* **69**(11):6908-22.
310. **Ventura M, Zink R.** 2003. Comparative sequence analysis of the *tuf* and *recA* genes and restriction fragment length polymorphism of the internal transcribed spacer region sequences supply additional tools for discriminating *Bifidobacterium lactis* from *Bifidobacterium animalis*. *Appl Environ Microbiol.* **69**(12):7517-22.

-
311. **Versalovic J, Koeth T, Lupski JR.** 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* **19**(24):6823-31.
312. **Vincent D, Roy D, Mondou F, Dery C.** 1998. Characterization of bifidobacteria by random DNA amplification. *Int J Food Microbiol.* **43**(3):185-93.
313. **de Vries, W., Gerbarndy, S.H., Stouthamer, A.H.,** 1967. Carbohydrate metabolism in *Bifidobacterium bifidum*. *Biochem. Biophys. Acta.* **136** : 415-425.
314. **de Vries, W., Stouthamer, A.H.,** 1968. Fermentation of glucose, lactose, galactose, mannitol and xylose by *Bifidobacteria*. *J. Bacteriol.* **196** : 472-478.
315. **de Vries W, Stouthamer AH.** 1969. Sensitivity of bifidobacteria to oxygen. *J Gen Microbiol.* **55**(3):13.
316. **Wagner E, Marcandier S, Egeter O, Deutscher J, Gotz F, Bruckner R.** 1995. Glucose kinase-dependent catabolite repression in *Staphylococcus xylosus*. *J Bacteriol.* **177**(21):6144-52.
317. **Wang, M., Steers, E., Norris, R.F.** 1963. Extracellular polysaccharide of mucoid *Lactobacillus bifidus*. *J. Bact.* **86**: 898-903.
318. **Wang X, Gibson GR.** 1993. Effects of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. *J Appl Bacteriol.* **75**(4):373-80.
319. **Warchol M, Perrin S, Grill JP, Schneider F.** 2002. Characterization of a purified beta-fructofuranosidase from *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697. *Lett Appl Microbiol.* **35**(6):462-7.
320. **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.
321. **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., et al.** 1987. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**, 463-464 .
322. **Waters VL, Guiney DG.** 1993. Processes at the nick region link conjugation, T-DNA transfer and rolling circle replication. *Mol Microbiol.* **9**(6):1123-30.
323. **Werner, H., Seeliger, H.P.R.** 1963. Diagnosis of bifidus bacteria and their differentiation from morphologically similar micro-organisms. *Arztl. Lab.* **9** (11) 357-368.

-
324. **Weiss, J. E., Rettger, L. F.** 1943. *Lactobacillus bifidus* Tissier and its biological position in the group of aciduric organisms. *J. Bact.* **27**: 39-40.
325. **Weisser P, Kramer R, Sprenger GA.** 1996. Expression of the *Escherichia coli pmi* gene, encoding phosphomannose-isomerase in *Zymomonas mobilis*, leads to utilization of mannose as a novel growth substrate, which can be used as a selective marker. *Appl Environ Microbiol.* **62**(11):4155-61.
326. **Wu LF, Reizer A, Reizer J, Cai B, Tomich JM, Saier MH Jr.** 1991. Nucleotide sequence of the *Rhodobacter capsulatus fruK* gene, which encodes fructose-1-phosphate kinase: evidence for a kinase superfamily including both phosphofructokinases of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **173**(10):3117-27.
327. **Yaeshima, T., T. Fujisawa, and T. Mitsuoka.** 1992. *Bifidobacterium globosum*, subjective synonym of *Bifidobacterium pseudolongum*, and description of *Bifidobacterium pseudolongum* subsp. *pseudolongum* comb. nov and *Bifidobacterium pseudolongum* subs. *globosum* comb. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* **15**:380-385.
328. **Yamamoto T, Morotomi M, Tanaka R.** 1992. Species-specific oligonucleotide probes for five *Bifidobacterium* species detected in human intestinal microflora. *Appl Environ Microbiol.* **58**(12):4076-9.
329. **Yamashita, Y., Ashihara, H.** 1988. Characterization of Hexokinase and Fructokinase from Suspension-Cultured *Catharanthus roseus* Cells. *Zeitschrift fur Naturforschung* **43**, 827, 1988.
330. **Yang L., Akao T., Kobashi K. and Hattori M.** 1996. Purification and Characterization of a Novel Sennoside-hydrolyzing beta-Glucosidase from *Bifidobacterium* Sp. Strain SEN, a Human Intestinal Anaerobe. *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 705-70.
331. **Youssef M, Muller-Beuthow W, Haenel H.** 1966. Isolation of bacteriophages for anaerobic lactobacilli from human feces. *Naturwissenschaften.* **53**(22):589-90.
332. **Youssef M, Mach F, Muller-Beuthow W, Haenel H.** 1970. Isolation and characterization of *Lactobacillus bifidus*-phages. *Zentralbl Bakteriol* [Orig]. **(4)**:495-509.
333. **Zani, G., B. Biavati, F. Crosiani, and D. Matteuzzi.** 1974. Bifidobacteria from the faeces of piglets. *J. Appl. Bacteriol.* **37**:537-547.
334. **Zechner EL.** 2004. The Horizontal Gene Pool: an ESF workshop summary. *Plasmid.* **51**(2):67-74.
335. **Zechner EL, Pruger H, Grohmann E, Espinosa M, Hogenauer G.** 1997. Specific cleavage of chromosomal and plasmid DNA strands in Gram-positive and

Gram-negative bacteria can be detected with nucleotide resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**(14):7435-40.

336. **Zembruski B, Chilco P, Liu XL, Liu J, Conway T, Scopes R.** 1992. Cloning, sequencing, and expression of the *Zymomonas mobilis* fructokinase gene and structural comparison of the enzyme with other hexose kinases. *J Bacteriol.* **174**(11):3455-60.