

FORMATION CONTINUE – ARTICLE DE SYNTHÈSE

Proposition pour un nouveau standard indicateur de la contamination d'origine fécale dans les aliments : le genre *Bifidobacterium*

DELCENSERIE V., CHINA B., GAVINI F., BEERENS H., DAUBE G.

Département des denrées alimentaires d'origine animale
Service de Microbiologie
Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège
Boulevard de Colonster, 20, Bât. B43b, 4000 Liège

Correspondance : Delcenserie Véronique, Tel: +32(0)4/366.40.14 ; Fax: +32(0)4/366.40.16 ;
v.delcenserie@ulg.ac.be

RESUME : Les microorganismes du genre *Bifidobacterium* sont presque toujours présents en proportions importantes dans les matières fécales. Les bifidobactéries sont étudiées aujourd'hui pour leurs effets bénéfiques sur le maintien de la santé grâce à leur rôle modulateur sur la flore intestinale.

Dans cette synthèse, l'intérêt porté aux bifidobactéries est cependant tout autre. En effet, lorsque l'on retrouve cette bactérie d'origine fécale sur la chaîne de production alimentaire, cela signifie souvent qu'il y a eu une contamination à une des étapes du processus. L'intérêt principal est que les différentes espèces animales abritent des espèces de bifidobactéries différentes. Il serait donc possible, grâce à cette caractéristique de déterminer l'origine de la contamination (humaine ou animale) ce qui est un avantage de taille par rapport à l'indicateur de contamination fécale actuellement utilisé, *Escherichia coli*.

Il est donc intéressant de mettre au point un test utilisant des techniques de génétique moléculaire afin de permettre une identification, voire une quantification rapide des espèces de bifidobactéries retrouvées dans les échantillons alimentaires. Le fait de connaître l'origine de la contamination permettra de mieux cibler les corrections à apporter dans les entreprises.

INTRODUCTION

L'appareil digestif des hommes et des animaux constitue un important réservoir de germes. Dans l'industrie agro-alimentaire, le risque que ces germes se retrouvent dans un produit fini est bien réel s'il y a eu une contamination lors du processus d'élaboration. La santé du consommateur est alors mise en danger. Pour éviter ces contaminations, des plans de maîtrise basés sur la méthode HACCP (*Hazard Analysis Critical Control Point*) sont mis en place. Pour chaque danger identifié, des mesures strictes sont appliquées afin de diminuer le risque de contamination, de survie ou de multiplication microbienne. Des procédures de surveillance quotidienne souvent basées sur des paramètres physiques ou chimiques veillent au bon fonctionnement du

système. Une étape de vérification reste cependant indispensable. Celle-ci peut être réalisée par des analyses visant à rechercher les microorganismes pathogènes ou, plus souvent, à dénombrer un groupe de bactéries associées au risque. Ces dernières doivent demeurer sous un certain seuil. Plusieurs bactéries peuvent être utilisées dans ce rôle d'indicateur pour la contamination fécale. *E. coli* est à ce jour le plus souvent utilisé mais les bactéries du genre *Bifidobacterium* semblent également être de bons candidats.

Ce genre est prédominant dans la flore intestinale de la plupart des espèces animales ainsi que chez l'homme (Biavati *et al.*, 2000). Les bifidobactéries sont aujourd'hui connues pour leurs qualités probiotiques (Kullen *et al.*, 1997; Takahiro

et al., 1999; Brigidi *et al.*, 2000) et de plus en plus largement utilisées dans les processus technologiques de fabrication des denrées alimentaires (Vinderola *et al.*, 2000). Qui ne connaît pas aujourd'hui le yaourt au « Bifidus actif » ?

Dans notre cas, ce n'est cependant pas cette application qui sera développée.

En tant qu'indicateur de contamination d'origine fécale, *Bifidobacterium* présente certains atouts qu'*E. coli* ne possède pas. Tout d'abord, *Bifidobacterium* est présent en plus grande proportion qu'*E. coli* dans les matières fécales. Ensuite, les espèces dominantes de *Bifidobacterium* sont différentes selon l'hôte colonisé. Par exemple, *B. pseudolongum* subsp. *globosum*, *B. boum*, se retrouvent essentiellement dans les matières

fécales des ruminants (Klein *et al.*, 1998) tandis que *B. adolescentis*, *B. dentium* et *B. longum* se retrouvent dans le tractus digestif de l'homme (Mangin *et al.*, 1996; 1999). Cette dernière caractéristique permettrait donc, si elle se vérifie dans des études ultérieures, de déterminer, en plus du niveau de contamination, l'origine de cette contamination. Ceci permettrait de mieux cibler les corrections à apporter dans les entreprises.

Tout d'abord, un bref rappel sur la flore bactérienne fécale sera présenté. La notion d'indicateur de contamination fécale et les critères microbiologiques légaux existants seront rappelés. Ensuite, les caractéristiques phénotypiques et génotypiques du genre *Bifidobacterium* seront abordées. Enfin, une brève description des méthodes traditionnelles de recherche des bifidobactéries sera développée. En rassemblant ces connaissances, il sera possible de justifier l'utilisation des bifidobactéries comme indicateurs de contamination fécale et d'esquisser des pistes quant aux moyens pratiques de leur utilisation.

LA CONTAMINATION FÉCALE

La flore fécale

Les intestins de l'homme et des animaux sont colonisés par des microorganismes, principalement bactériens, de l'ordre de 10^{11} cellules par gramme de contenu intestinal. Cette microflore commensale est constituée de 400 à 500 espèces bactériennes qui appartiennent en réalité à 3 ou 4 grands groupes phylogénétiques différents. Ces bactéries occupent différentes zones du tractus intestinal, mais sont les plus abondantes au niveau du gros intestin. Elles constituent la flore dite de barrière et participent à de nombreux mécanismes mal connus qui vont maintenir l'équilibre de cette flore. Les zones occupées par ces bactéries deviennent alors difficilement accessibles à d'autres bactéries, peut-être pathogènes, qui pourraient chercher à s'y placer au cours de la vie de l'individu et provoquer des troubles intestinaux. C'est la raison pour laquelle cette flore est importante dans le maintien de la santé (Jansen *et al.*, 1999).

Il s'agit principalement de bactéries anaérobies strictes. Selon les méthodes de dénombrement utilisées,

les proportions des différents genres bactériens sont variables. Néanmoins, le genre prédominant est *Bacteroides* (35 à 65% de la flore microbienne totale), suivi par le genre *Bifidobacterium* (4-5 à 12%) et enfin par les entérobactéries englobant les coliformes (3%). De nombreuses autres espèces sont également présentes (*Lactobacillus*, *Actinobacterium*, *Clostridium*,...) de manière permanente ou transitoire, mais dans des proportions nettement moindres.

Les indicateurs de contamination d'origine fécale

Certaines bactéries ou groupes bactériens mis en évidence par des tests spécifiques peuvent être considérés comme témoins de contamination d'origine fécale et indiquer la présence possible de pathogènes d'écologie similaire. Le choix d'un tel indicateur doit répondre à un certain nombre d'exigences ou de critères (Catsaras, 1991; Jouve, 1998) :

- ils doivent toujours être présents lorsque les microorganismes pathogènes sont présents ;
- ils doivent apparaître en plus grand nombre que les agents pathogènes associés;
- ils doivent avoir le même comportement que les agents pathogènes dans l'environnement naturel et au cours des procédés de fabrication ;
- ils doivent être mis en évidence, dénombrés et identifiés à l'aide de techniques simples.

Les critères légaux dans les denrées alimentaires d'origine animale

Les critères microbiologiques ne sont pas établis seulement pour des indicateurs de contamination fécale. La législation a tenu compte également d'autres microorganismes, dont certains font appel directement à la recherche des agents pathogènes.

La contamination d'origine fécale était anciennement mise en évidence par le dénombrement des coliformes regroupant des entérobactéries telles que *E. coli*, mais aussi des genres comme *Klebsiella*, *Enterobacter*, ... Cependant, certains coliformes ne sont pas d'origine fécale et peuvent être à l'origine de résultats faussement positifs.

Parfois, la présence d'entérobactéries témoigne d'une contamination en cours de processus et plus particulièrement d'une recontamination après traitement thermique. C'est le cas du groupe des coliformes totaux incluant non seulement des espèces communes dans les fèces humaines ou animales (*E. coli* par exemple) mais surtout des micro-organismes ubiquistes tels que les genres *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Erwinia*, qui regroupent des coliformes d'origine fécale et non fécale. La famille des *Enterobacteriaceae* peut aussi indiquer ce type de contamination. Leur présence ne peut pas être corrélée uniquement à une contamination d'origine fécale : elle indique seulement un défaut de maîtrise de l'hygiène générale comme le dénombrement des germes totaux aérobies mésophiles. La notion de coliformes fécaux ou thermotolérants a été proposée pour mieux cibler la contamination d'origine fécale, mais beaucoup d'auteurs ont démontré que cette association était souvent erronée (Leclercq *et al.*, 2002). Ces auteurs ont dès lors proposé l'espèce *E. coli* comme indicateur spécifique. Le développement de nouveaux milieux chromogènes spécifiques de l'espèce *E. coli* a permis à cet indicateur de se généraliser à raison dans la législation européenne et mondiale.

Staphylococcus aureus peut être considéré comme témoin de contamination d'origine humaine ou animale, mais plutôt d'origine cutanéomuqueuse. A très haute concentration, il peut être dangereux à cause de sa production d'entérotoxines.

Certains germes pathogènes, différents selon le type de denrée, sont aussi recherchés directement.

Ainsi, pour le lait cru, le lait traité thermiquement et les produits à base de lait, les germes pathogènes repris dans les critères sont *Listeria monocytogenes* et *Salmonella spp.*

Pour les viandes hachées et les préparations de viande, le seul germe pathogène recherché est *Salmonella spp.* Le réservoir de *Salmonella* est le tube digestif des animaux et de l'homme. Son potentiel de multiplication dans l'environnement des entreprises est réduit et sa principale source est donc la contamination fécale directe ou une contamination croisée entre les produits crus et les produits traités thermiquement.

Par contre, *Listeria monocytogenes*, même si elle peut provenir du tube digestif, reste un germe d'environnement. C'est un germe psychrotrophe capable de se multiplier pendant la conservation à basse température de l'aliment. Il n'est donc pas un bon indicateur de contamination fécale.

La combinaison de ces différents critères permet d'affiner les scénarios de contamination. Dans ce but, disposer d'un indicateur de contamination fécale le plus sensible et le plus spéci-

fique possible est essentiel. Les nombreuses évolutions développées ci-dessus et menant au dénombrement d'*E.coli* en attestent.

Le tableau I reprend les différents critères microbiologiques définis pour les denrées alimentaires d'origine animale dans la législation européenne (Codex Alimentarius Commission, 1979; 1997, directive 92/46/CEE et 94/65/CE).

Nature des contaminations

Plusieurs types de contamination d'un produit sont possibles. La contamination peut être de nature biologique, chimique ou physique. Dans le cadre d'une contamination de nature microbiologique, il peut s'agir de microorganismes pathogènes, altérants ou technologiques. En fonction du genre, de l'espèce ou même de la souche impliquée, les conséquences peuvent donc être très différentes. Au

Tableau I : Critères microbiologiques pour les denrées alimentaires d'origine animale en Europe

Catégorie d'aliment	Microorganismes	Limite	Plan d'échantillonnage			
			n	c	m	M
Carcasses de bovins, ovins, caprins et solipèdes	GermeS totaux aérobies		5-10		3,5 log cfu/cm ²	5,0 log cfu/cm ²
	<i>Enterobacteriaceae</i>		5-10		1,5 log cfu/cm ²	2,5 log cfu/cm ²
Carcasse de porc	GermeS totaux aérobies		5-10		4,0 log cfu/cm ²	5,0 log cfu/cm ²
	<i>Enterobacteriaceae</i>		5-10		2,0 log cfu/cm ²	3,0 log cfu/cm ²
Viandes hâchées (directive 94/65/CEE)	GermeS mésophiles aérobies		5	2	5x10 ⁵ cfu/g	5x10 ⁶ cfu/g
	<i>E. coli</i>		5	2	50 cfu/g	500 cfu/g
	<i>Salmonella</i>	Absence dans 10 g	5	0		
	<i>S. aureus</i>		5	2	100 cfu/g	1000 cfu/g
Préparations de viande (directive 94/65/CEE)	<i>E. coli</i>		5	2	500 cfu/g	5000 cfu/g
	<i>S. aureus</i>		5	1	500 cfu/g	5000 cfu/g
	<i>Salmonella</i>	Absence dans 1 g	5	0		
Lait cru destiné à la transformation (directive 92/46/CEE)	Teneur en germeS totaux après incubation à 30°C	10 ⁶ cfu/ml	Lait de vache			
		5x10 ⁵ cfu/ml ou 1,5x10 ⁶ cfu/ml	Lait de buffonne, de chèvre et de brebis			
	<i>S. aureus</i>	Lait destiné à la fabrication de produits crus	5	2	500 cfu/ml	2000 cfu/ml
Lait cru de vache destiné à la consommation humaine directe (directive 92/46/CEE)	<i>Salmonella</i>	Absence dans 25g	5	0		
	<i>S. aureus</i>		5	2	100 cfu/ml	500 cfu/ml
	Teneur en germeS totaux après incubation à 30°C	5x10 ⁵ cfu/ml				

Tableau I : Critères microbiologiques pour les denrées alimentaires d'origine animale en Europe (suite)

Lait pasteurisé (directive 92/46/CEE)	Microorganismes pathogènes	Absence dans 25g	5	0		
	Coliformes		5	1	0 cfu/ml	5 cfu/ml
	Teneur en germes totaux après incubation à 21°C		5	1	5x10 ⁶ cfu/g	5x10 ⁷ cfu/g
Lait UHT et lait stérilisé (directive 92/46/CEE)	Teneur en germes totaux après incubation à 30°C	10 cfu/0,1ml				
Fromages au lait cru et au lait thermisé (directive 92/46/CEE)	<i>Listeria monocytogenes</i>	Absence dans 1g (fromage à pâte dure) ou dans 25g (autres)	5	0		
	<i>Salmonella</i>	Absence dans 1g	5	0		
	<i>S. aureus</i>		5	2	1000 cfu/g	10 000 cfu/g
	<i>E. coli</i>		5	2	10 ⁴ cfu/g	10 ⁵ cfu/g
Fromage à pâte molle (au lait traité thermiquement) (directive 92/46/CEE)	<i>Listeria monocytogenes</i>	Absence dans 25g	5	0		
	<i>Salmonella</i>	Absence dans 1g	5	0		
	<i>S. aureus</i>		5	2	100 cfu/g	1000 cfu/g
	<i>E. coli</i>		5	2	100 cfu/g	1000 cfu/g
	Coliformes		5	2	10 ⁴ cfu/g	10 ⁵ cfu/g
Fromage frais (directive 92/46/CEE)	<i>Listeria monocytogenes</i>	Absence dans 25g	5	0		
	<i>Salmonella</i>	Absence dans 1g	5	0		
	<i>S. aureus</i>		5	2	10 cfu/g	100 cfu/g
Autres fromages (directive 92/46/CEE)	<i>Listeria monocytogenes</i>	Absence dans 1g (fromage à pâte dure) ou dans 25g (autres)	5	0		
	<i>Salmonella</i>	Absence dans 1g	5	0		
Beurre (directive 92/46/CEE)	<i>Listeria monocytogenes</i>	Absence dans 1g	5	0		
	<i>Salmonella</i>	Absence dans 1g	5	0		
	coliformes		5	2	0 cfu/g	10 cfu/g
Poudre de lait et produits à base de lait (directive 92/46/CEE)	<i>Salmonella</i>	Absence dans 1g	5	0		
	<i>Listeria monocytogenes</i>	Absence dans 1g	5	0		
	<i>S. aureus</i>		5	2	10 cfu/g	100 cfu/g
	coliformes		5	2	0 cfu/g	10 cfu/g

n = nombre d'échantillons analysés sur la période

m ou *3m* = limite de satisfaction

M = limite d'acceptabilité

c = nombre d'échantillons tolérés entre *3m* et *M*

CFU = colony forming unit

(SCF : Scientific Committee for Food, Sanco 1252/2001 rev.4 ; 31/10/2001).

Tableau I : Critères microbiologiques pour les denrées alimentaires d'origine animale en Europe (suite)

Produits congelés à base de lait (directive 92/46/CEE)	<i>Salmonella</i>	Absence dans 1g	5	0		
	<i>Listeria monocytogenes</i>	Absence dans 1g	5	0		
	<i>S. aureus</i>		5	2	10 cfu/g	100 cfu/g
	coliformes		5	2	10 cfu/g	100 cfu/g
	Dénombrements des germes totaux		5	2	10 ² cfu/g	5x10 ² cfu/g
Produits liquides à base de lait (directive 92/46/CEE)	<i>Salmonella</i>	Absence dans 1g	5	0		
	<i>Listeria monocytogenes</i>	Absence dans 1g	5	0		
	coliformes		5	2	0 cfu/g	5 cfu/g
	Dénombrements des germes totaux		5	2	5x10 ⁴ cfu/g	10 ⁵ cfu/g
Mollusques bivalves vivants (directive 91/492/CEE)	<i>Salmonella</i>	Absence dans 25g				
	Coliformes fécaux	<300/100g (consommation directe) Zone A <6000/100g (consommation après traitement de pasteurisation ou épluchage) Zone B <60000/100g (consommation après épluchage de longue durée) Zone C				
	<i>E. coli</i>	<230/100g (consommation directe) Zone A <4600/100g (consommation après traitement de pasteurisation ou épluchage) Zone B				
Crustacés et mollusques à coquille cuits (directive 93/51/CEE)	<i>Salmonella</i>	Absence dans 25g	5	0		
	<i>S. aureus</i>		5	2	100 cfu/g	1000 cfu/g
	Germes pathogènes	Quantités pouvant affecter la santé de l'homme				
	Coliformes thermotolérants		5	2	10 cfu/g	100 cfu/g
	<i>E. coli</i>		5	1	10 cfu/g	100 cfu/g
	Germes mésophiles aérobies	Produits entiers Produits décortiqués et décoquillés Chair de crabe	5 5 5	2 2 2	10 ¹ cfu/g 5x10 ⁴ cfu/g 10 ² cfu/g	10 ³ cfu/g 5x10 ² cfu/g 10 ² cfu/g
Ovoproduits (directive 89/437/CEE)	<i>Salmonella</i>	Absence dans 25g				
	Germes mésophiles aérobies	10 ¹ cfu/g ou ml				
	<i>Enterobacteriaceae</i>	100 cfu/g ou ml				
	<i>S. aureus</i>	Absence dans 1g				

niveau de la santé publique, il est moins grave d'avoir une contamination par un germe altérant tel qu'un *Pseudomonas* que par un germe pathogène. D'un point de vue technologique par contre, cette contamination est très grave parce qu'elle a une influence sur la durée de vie du produit (Gélinas, 1995).

Dans le secteur agro-alimentaire, il faut partir du principe qu'on doit éviter toute forme de contamination, même si le risque zéro n'existe pas.

Il est difficile de maîtriser ces contaminations étant donné leurs origines diverses. Pour les denrées d'origine animale, il peut s'agir d'une contamination provenant des animaux eux-mêmes, d'erreurs d'hygiène lors des manipulations humaines, d'un non respect de la marche en avant du secteur "sale" vers le secteur "propre" ou d'une contamination croisée à l'abattoir.

LE GENRE BIFIDOBACTERIUM

Historique

Au cours de ses recherches sur la flore du nourrisson en 1899 et 1900, Tissier découvre des bacilles à Gram positifs incurvés, souvent bifides, qu'il nomme *Bacillus bifidus communis* (Figure 1). De 1900 à 1957, cette espèce est incluse dans la famille des *Lactobacillaceae* sous le nom de *Lactobacillus bifidus* (Winslow, 1917; Holland, 1920). En 1927, Orla-Jensen reconnaît l'existence du genre *Bifidobacterium* mais étant donné ses similitudes avec le genre *Lactobacillus*, les bifidobactéries resteront assimilées au genre *Lactobacillus* jusqu'en 1957. En 1957, Dehnart réalise qu'il existe plusieurs biotypes de *Bifidobacterium*. Il faudra attendre 1963 pour que Reuter découvre sept

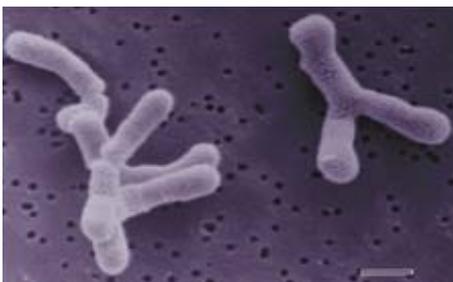


Figure 1: *Bifidobacterium adolescentis*;
Echelle: 1 mm; Centre de recherche et de développement sur les aliments
Adresse URL:
<http://sci.agr.ca/crda/Français/microsc.htm>

espèces du genre *Bifidobacterium*. C'est dans la 8^e édition du *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Rogosa, 1974) que le genre *Bifidobacterium* est reconnu. Il est inclus dans la famille *Actinomycetaceae* de l'ordre des *Actinomycetales* (Biavati *et al.*, 2000).

Propriétés phénotypiques

Morphologie

Différentes morphologies cellulaires sont obtenues selon les conditions de culture (Scardovi *et al.*, 1986). Une comparaison de la morphologie cellulaire a été réalisée sur un grand nombre de souches remises en culture en anaérobiose dans du milieu TPY (*Trypticase-Phytone-Yeast*). Cette étude a montré que certaines espèces présentaient une forme cellulaire caractéristique qui pouvait aider à leur reconnaissance. Par exemple, la disposition en «V» ou en palissade est caractéristique chez *B. angulatum*, l'alignement d'éléments globulaires chez *B. catenulatum*, de longues chaînes de cellules régulières chez *B. pullorum*,... Mais, le plus souvent, la morphologie cellulaire ne permet pas une bonne différenciation du genre et de l'espèce. Même l'aspect bifide des extrémités des bâtonnets sont rencontrés aussi chez les genres *Corynebacterium* et *Propionibacterium*. Cette caractéristique a donné lieu à de

nombreuses études et à des interprétations contradictoires. Anciennement, les formes vésiculeuses étaient considérées comme des formes de souffrance indiquant une mort prochaine (Prévot *et al.*, 1967). Une autre hypothèse serait que les massues sont des amas d'ADN en rapport avec un processus de conjugaison. Les formes globuleuses ont été assimilées aux protoplastes: il s'agirait de formes ayant une paroi incomplète, apparaissant sur des milieux capables de provoquer la croissance mais incapables de servir à la synthèse des constituants de la paroi.

Structure de la paroi et de la membrane cellulaire

La paroi cellulaire des bifidobactéries a une structure spécifique aux bactéries Gram-positives. Elle est constituée d'une épaisse couche de muréine (peptidoglycane) entremêlée de longues chaînes de polysaccharides ainsi que de protéines et d'acides lipoteichoïques (figure 2). La couche de muréine permet à ces bactéries de vivre dans un milieu ambiant qui est fréquemment hypotonique. Les protéines et les acides lipoteichoïques déterminent le caractère hydrophobe de la surface des bifidobactéries (Op Den Camp *et al.*, 1985). La structure du peptidoglycane des bifidobactéries est plus proche des *Lactobacillaceae* que des *Actinomycetaceae* (Scardovi, 1986).

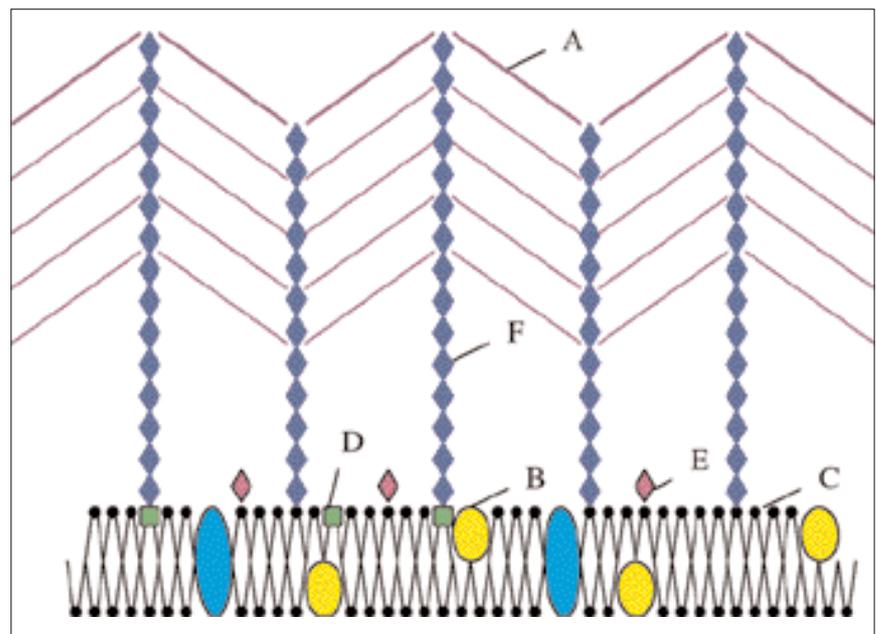


Figure 2: Modèle pariétal d'une bactérie Gram positive :
A : peptidoglycane
B : protéine
C : phospholipide
D : glycolipide
E : phosphatidylglycolipide
F : acide lipoteichoïque

La composition en acides aminés de la muréine est variable selon les espèces et les souches d'une même espèce. Les acides aminés les plus fréquemment retrouvés sont la L-alanine, l'acide glutamique, la L-ornithine et la D-alanine. Pour certaines espèces et même certaines souches d'une même espèce, l'ornithine est remplacée par de la lysine.

Au niveau des composants polysaccharidiques de la paroi cellulaire, le glucose, le galactose et le rhamnose sont les plus fréquemment trouvés (Scardovi, 1986). Des différences qualitatives et quantitatives sont observées selon les espèces, les souches et les conditions de croissance.

Les acides lipotéichoïques forment des liaisons avec les chaînes de polysaccharides et semblent importants pour l'adhésion cellulaire des bifidobactéries à la paroi intestinale. Plusieurs bifidobactéries ont des lipoglycans de structures variables. Des études immunochimiques ont démontré que les acides lipotéichoïques portent un antigène commun aux différentes espèces du genre *Bifidobacterium*.

La composition en phospholipides de la membrane est un bon critère de différenciation. Seul *Bifidobacterium* contient des polyglycérolphospholipides et leurs lysodérivés, l'alanylphosphatidylglycerol et les lysodéri-

vés du diphosphatidylglycérol. Des essais de réactions croisées avec des extraits phénoliques d'acides lipotéichoïques de *Bifidobacterium* et de *Lactobacillus* montrent que seuls les premiers réagissent. Il est, dès lors, intéressant d'envisager un sérogroupage avec, comme antigènes de groupe les acides lipotéichoïques (Op Den Camp *et al.*, 1985). Les effets des conditions de croissance sur la composition en lipides ont été étudiés par Veerkamp (1977).

Métabolisme des hydrates de carbones

Le fructose est dégradé par fermentation selon une cascade de réactions aboutissant à la formation d'acétate et de lactate (Figure 3). Normalement 75% d'acétate sont formés pour 50% de lactate. L'enzyme clé de ce mécanisme est la Fructose-6-phosphate phosphokétolase (F6PPK) qui scinde l'hexose-P en érythrose-4-P et acétylphosphate. Cependant, la dégradation du pyruvate en acide formique et acétylphosphate et la réduction de cet acétylphosphate en éthanol peuvent modifier le ratio en faveur d'une production d'acétate, acide formique et éthanol plutôt qu'en faveur d'une production de lactate (Scardovi et Trovatelli, 1965; De Vries *et al.*, 1967; Veerkamp *et al.*, 1978).

Besoins nutritionnels

Besoins en composés azotés

Les N-acétylglucosamine et N-acétyllactosamine présents dans le lait stimulent la croissance des bifidobactéries. Le N-acétylglucosamine est un précurseur essentiel à la synthèse du peptidoglycane. Quand le milieu de culture contient un excès de N-acétylglucosamine, les bifidobactéries ont une forme plus régulière (Modler, 1997).

Les bifidobactéries sont capables d'utiliser les sels d'ammonium (azote inorganique) comme seule source d'azote. Ces espèces, lorsqu'elles croissent sans source d'azote organique, rejettent des taux considérables d'acides aminés dans le milieu. Par exemple, *B. bifidum* peut produire jusqu'à 150 mg/litre de thréonine. En général, les acides aminés les plus souvent produits sont l'alanine, la valine, l'acide aspartique et la thréonine (Matteuzzi *et al.*, 1978).

Les bifidobactéries sont généralement incapables de réduire les nitrates en nitrites.

Besoins en vitamines et sels minéraux

Les besoins en minéraux ont surtout été étudiés chez *B. bifidum*. Cette espèce a besoin de fer, de magnésium et de manganèse (Bezkorovainy et

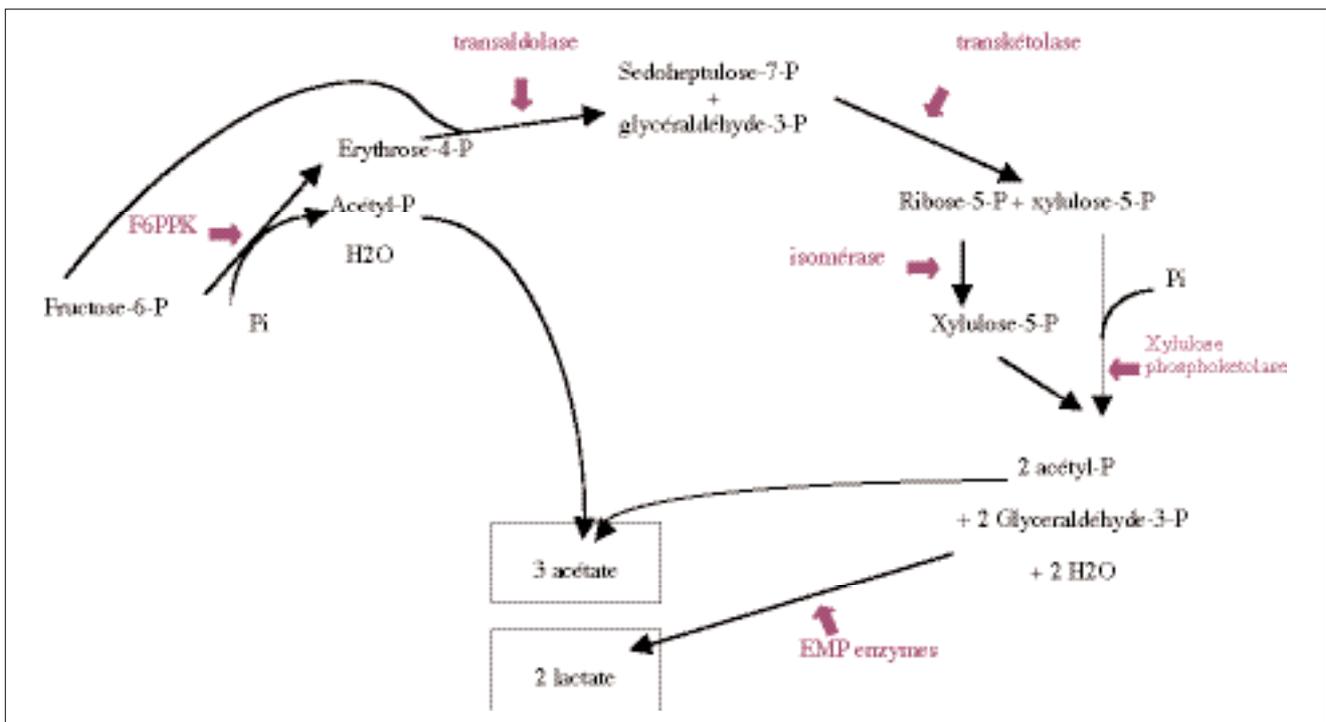


Figure 3 : Dégradation du fructose par fermentation selon une cascade de réactions aboutissant à la formation d'acétate et de lactate (De Vries *et al.*, 1967).

Topouzian, 1981). Le fer peut être présent sous ses deux formes, ferreux ou ferrique.

Le fer ferreux (Fe⁺²) est assimilé essentiellement à pH acide (Bezkorovainy et Topouzian, 1983). Son incorporation est régie par plusieurs facteurs. A faible concentration, le transport de la molécule dans la bactérie dépend, entre autres, de la température (Bezkorovainy 1984 ; Bezkorovainy *et al.*, 1986). A forte concentration, l'affinité du germe pour le fer diminue et l'incorporation devient indépendante de la température. Le transport de la molécule dépendrait, dans les deux cas, d'une ATPase membranaire et son incorporation est inhibée compétitivement par le zinc (Bezkorovainy et Topouzian, 1982 ; Bezkorovainy *et al.*, 1986). Le fer ferrique (Fe⁺³) n'est incorporé par *B. bifidum* qu'à pH neutre. Il existe deux systèmes d'assimilation selon le mode de présentation du fer. Sous forme monomérique, le transport dépend de la température et de la présence d'une substance sécrétée par la bactérie, et est inhibé par différents inhibiteurs métaboliques. Inversement, la forme polymérique est incorporée sans que ces différents facteurs n'interviennent. Les deux systèmes sont saturables par le fer, indiquant ainsi la présence d'un transporteur associé à la membrane et (ou) un nombre limité de sites récepteurs à la surface de la bactérie (Bezkorovainy *et al.*, 1986 ; Ueda *et al.*, 1983).

De nombreuses souches humaines sont capables de produire des vitamines qu'elles libèrent dans le milieu. Cette capacité est variable selon les espèces. Deguchi et ses collaborateurs (1985) distinguent ainsi trois groupes, sur la base de la production et de la libération de thiamine, acide nicotinique et acide folique. *B. bifidum* et *B. infantis* les accumulent en grande quantité alors que *B. breve* et *B. longum* sont de faibles producteurs. Parmi les espèces faiblement productrices de vitamines, il existe certaines souches de l'espèce *B. adolescentis* ne synthétisant aucune vitamine.

Besoins en facteurs de croissance

Plusieurs substances ont un effet «facteur de croissance». Le lactulose est très efficace d'une part parce qu'il diminue le pH ambiant et d'autre part parce qu'il permet aux bifidobactéries

d'adopter leur forme spécifique en «Y» ou en «V».

Les chaînes courtes de fructo-oligosaccharides appelées «néosugars» sont encore plus intéressantes car en plus de favoriser la croissance des bifidobactéries, elles empêchent la croissance de *Clostridium* et d'*E. coli*. Enfin, d'autres substances comme le lactosucrose, le lactisol et les xylooligosaccharides sont également décrites comme ayant un effet positif sur la croissance des bifidobactéries (Modler, 1997).

Activité uréasique

Les souches les plus fréquemment uréolytiques sont celles appartenant à l'espèce *B. suis* (80% des souches sont uréolytiques). Toutes les autres espèces possèdent également des souches uréolytiques sauf *B. cuniculi*. Les bifidobactéries d'origine humaine sont moins souvent uréolytiques (moins de 10 %) (Crociani et Matteuzi, 1982).

Anaérobiose

Les bifidobactéries sont des microorganismes anaérobies stricts qui ne se développent pas en présence d'oxygène. Cependant, la sensibilité à l'oxygène est différente selon les souches et les espèces. Il existe en effet des souches moins strictes que d'autres pouvant supporter une tension d'oxygène de 10 cm de mercure. Certaines souches ont même donné naissance à des mutants facultatifs. D'une manière générale, les espèces du genre *Bifidobacterium* ne peuvent pas se développer en présence d'oxygène, mais survivent cependant (Beerens *et al.*, 2000).

Sensibilité aux antibiotiques

Les bifidobactéries sont sensibles aux pénicillines telles que l'ampicilline ou la pénicilline G, aux céphalosporines de première génération, aux tétracyclines, aux macrolides tels que l'érythromycine, aux lincosamides tels que la clindamycine et enfin au chloramphénicol.

Elles sont par contre résistantes aux aminosides tels que la néomycine, la kanamycine, la gentamycine et la streptomycine. Une résistance aux polymycines telles que la polymycine B a également été observée ainsi que pour le thriméthoprime et le metroni-

dazole (Rada et Dlebal, 1998). Les mécanismes de résistance sont encore peu connus (Lim *et al.*, 1993). La résistance intrinsèque à la néomycine et à la kanamycine a été largement exploitée pour améliorer la sélectivité des milieux de culture. Des limites sont cependant observées à cause de la grande variabilité entre les espèces (Charteris *et al.*, 1998).

Pouvoir pathogène

Les espèces du genre *Bifidobacterium* ne possèdent ni endotoxine (bactérie Gram positive), ni exotoxine. Ce genre n'est pas considéré comme pathogène. Cependant, son pouvoir acidogène est tellement intense qu'il peut provoquer des irritations locales (cystites hémorragiques) ou même des destructions : ainsi la présence de l'espèce *B. dentium* dans les dents cariées a incité de nombreux auteurs à l'incriminer comme agent de corrosion de la dentine et de l'émail. A ce jour, l'espèce *B. dentium* est considérée comme potentiellement pathogène, bien qu'on la trouve dans la flore intestinale humaine à des taux relativement bas (104-105-cfu de matière fécale) (Crociani *et al.*, 1996 ; Civen *et al.*, 1993).

B. longum, également, a été incriminé dans un cas de septicémie (Ha *et al.*, 1999).

L'injection aux animaux de cultures ou de suspensions microbiennes ne provoque cependant aucune lésion ni aucun trouble. Bien au contraire, sa présence dans l'intestin est une cause ou un témoin de l'équilibre bactérien intestinal, et son implantation dans un intestin dont la microflore est déséquilibrée rétablit rapidement cet équilibre, d'où la thérapie possible des troubles intestinaux par l'ingestion ou l'implantation indirecte de la flore bifide. Ces microorganismes sont de plus en plus régulièrement incorporés à des denrées alimentaires dans l'espoir qu'un apport supplémentaire de cette bactérie dans l'alimentation ait un effet favorable sur la santé humaine.

Propriétés génotypiques

La composition en bases cytosine-guanine de l'ADN

Les bifidobactéries ont un pourcentage en base G+C plus élevé que la plupart des autres espèces bacté-

Tableau II: approche phylogénétique pour l'analyse du genre *Bifidobacterium* sur base de la séquence partielle du gène *hsp60* (Jian et al., 2001).

Groupe phylogénétique	Genre et espèce bactériens	% en guanine-cytosine de la séquence partielle du gène <i>hsp60</i>
1	<i>B. inopinatum</i> <i>Gardnerella vaginalis</i>	45%
2	<i>B. denticolens</i>	55%
3	<i>B. asteroides</i> <i>B. coryneforme</i> <i>B. indicum</i> <i>B. minimum</i> <i>B. animalis</i> <i>B. lactis</i> <i>B. gallicum</i> <i>B. magnum</i> <i>B. choerinum</i> <i>B. cuniculi</i> <i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>Pseudolongum</i> <i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i> <i>B. suis</i> <i>B. infantis</i> <i>B. longum</i> <i>B. breve</i> <i>B. adolescentis</i> <i>B. ruminantium</i> <i>B. catenulatum</i> <i>B. pseudocatenulatum</i> <i>B. dentium</i> <i>B. angulatum</i> <i>B. merycicum</i> <i>B. bifidum</i> <i>B. gallinarum</i> <i>B. pullorum</i> <i>B. bovis</i> <i>B. thermophilum</i> <i>B. thermophilum</i>	55 à 67%

Tableau III: approche phylogénétique pour l'analyse du genre *Bifidobacterium* sur base de la séquence partielle du gène *16SrDNA* (Miyake et al., 1998).

Groupe phylogénétique	Genre et espèce bactériens	% en guanine-cytosine de la séquence partielle du gène <i>16SrDNA</i>
1	<i>B. inopinatum</i> <i>B. denticolens</i> <i>Gardnerella vaginalis</i> <i>B. subtile</i> <i>B. breve</i> <i>B. infantis</i> <i>B. longum</i> <i>B. suis</i> <i>B. pullorum</i> <i>B. gallinarum</i> <i>B. saeculare</i> <i>B. bifidum</i> <i>B. dentium</i>	45-55%
2	<i>B. adolescentis</i> <i>B. ruminantium</i> <i>B. pseudocatenulatum</i> <i>B. catenulatum</i> <i>B. merycicum</i> <i>B. angulatum</i> <i>B. minimum</i> <i>B. asteroides</i> <i>B. coryneforme</i> <i>B. indicum</i> <i>B. bovis</i> <i>B. thermophilum</i> <i>B. magnum</i> <i>B. gallicum</i> <i>B. cuniculi</i> <i>B. lactis</i> <i>B. animalis</i> <i>B. choerinum</i> <i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>globosum</i> <i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i>	55-67%

riennes. Ce taux est en général supérieur à 55% par rapport aux bases A+T. On peut cependant classer les bifidobactéries en 3 groupes: les «G+C riches» (55-67%), les «G+C pauvres» (45%) et les bifidobactéries ayant un % G+C intermédiaire (55%). Ces trois groupes correspondent à trois phylum évolutifs différents (Jian et al., 2001; tableau II).

Les plasmides

Vingt pour cent des souches de bifidobactéries contenaient un ou plusieurs plasmides dans les 4 espèces concernées par une étude de Sgorbati et al. en 1982, à savoir, *B. longum*, *B. globosum*, *B. asteroides* et *B. indicum*.

B. longum est la seule espèce d'origine humaine dont 70% des souches sont porteuse d'ADN extrachromosomique (Sgorbati et al., 1982; Sgorbati et al., 1986). De manière étonnante, *B. infantis*, souvent présent avec *B. longum* dans les prélèvements, ne présente pas de plasmides (Neut et al., 1981; Scardovi et al., 1986).

B. longum possède plusieurs types de plasmides. Certains sont cryptiques comme le pMB1 (Matteuzzi et al., 1990; Rossi et al., 1996) tandis que d'autres tels que le pKJ50 (Park et al., 1999) ne le sont pas et possèdent des gènes codant pour des protéines. Ces protéines présentent de grandes similitudes dans leur séquence en acides aminés avec des protéines de réplication de plasmides, des protéines de mobilité ou des protéines trans-membranaires.

Les séquences d'ADN étudiées

L'étude de la séquence de l'ADN est un bon moyen pour pouvoir identifier une espèce bactérienne, mais aussi pour pouvoir étudier le lien de parenté entre des souches appartenant à une même espèce. En ce qui concerne les bifidobactéries, certaines régions du génome ont particulièrement été étudiées.

Le gène codant pour l'ARN ribosomal 16S

L'analyse du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S (16SrDNA) est un moyen utile pour identifier des relations phylogéniques entre les espèces (Mangin et al., 1996; 1999). Le 16SrDNA a été séquencé pour presque toutes les espèces et sous-

Tableau IV : Milieux de culture non sélectifs couramment utilisés pour l'enrichissement des échantillons alimentaires ou de matières fécales contenant des bifidobactéries.

Abréviation du milieu	Nom complet du milieu	Références
BIII/BIIIA	Brain Heart Infusion/agar	(Roberts et al., 1992)
BBA	Brucella Blood Agar	(Hartemink et Rombouts, 1999)
RCA/RCM	Reinforced Clostridium Agar/Medium	(Venkateshwer Rao et al., 1994)
CBA	Columbia Blood Agar	(Bartram et al., 1994)
BIII BA	Brain Heart Infusion Blood Agar	(Roberts et al., 1992)
MRS	Man Rogosa and Sharpe Medium	(Venkateshwer Rao et al., 1994)

Tableau V : Milieux de culture utilisés pour sélectionner les bifidobactéries à partir de produits laitiers ou à base de viande (Silvi et al., 1996, Hartemink et Rombouts, 1999).

Num du milieu + référence	Caractéristiques
BSI agar (Mitsuoka et al., 1965)	Peu sélectif. Colonies du genre <i>Bifidobacterium</i> d'apparence différente.
Beeren agar (Beeren, 1990 et 1999)	Sélectif. Croissance possible cependant de certaines espèces de <i>Clostridium</i> ou <i>Lactobacillus</i> . Apparence semblable des colonies.
BIM-25 agar modifié. <i>Bifidobacterium</i> iodacetate medium 25 (Munoz et Pares, 1998) modifié.	Peu sélectif. Apparence semblable des colonies.
Willing Chalgren agar modifié (Hartemink R., Rombouts FM, 1999)	Colonies jaunes-vertes avec un halo jaune
TPY agar modifié (Scardovi, 1986)	

espèces de bifidobactéries. Ce gène est très bien conservé, jusqu'à 99% dans le genre *Bifidobacterium*. En tenant compte de la séquence du 16SrDNA, presque toutes les espèces du genre *Bifidobacterium* et l'espèce *Gardnerella vaginalis* appartiennent à un groupe phylogénétiquement distinct des autres genres (Miyake et al., 1998; tableau III).

Le gène codant pour la protéine Hsp60

La séquence partielle du gène codant pour la protéine de choc thermique de 60kDa (*hsp60*) de 30 espèces de bifidobactéries ainsi que de *G. vaginalis* a été déterminée (Jian et al., 2001) afin d'étudier la taxonomie du genre. Il a été établi que la similitude de

séquence est de 99,4 à 100% dans la même espèce, 96% en cas de sous-espèces et 73-96% (85% en moyenne) entre les différentes espèces. La similitude entre la séquence du gène *hsp60* de *G. vaginalis* et les séquences de *Bifidobacterium* est de l'ordre de 75%. Cette classification semble être meilleure que la classification par le 16SrDNA car le dendrogramme obtenu est mieux corrélé avec le contenu en G+C. Avec le classement phylogénique basé sur *hsp60*, toutes les bactéries «G+C riches» (55-67%, la plupart des espèces du genre *Bifidobacterium*) sont dans un même cluster tandis que les bactéries «G+C pauvres» (45%, *B. inopinatum*) se retrouvent dans un autre cluster avec *G. vaginalis*. Un troisième

groupe est formé par des bifidobactéries ayant un «G+C moyen» (55%, *B. denticolens*) (Tableau II).

L'espace intergénique 16S-23S

Les gènes codant pour les ARN ribosomiaux 16S et 23S forment un opéron présent en plusieurs copies.

Autant la séquence du 16SrDNA est un bon moyen d'identification du genre *Bifidobacterium*, autant la séquence nucléotidique située dans l'espace intergénique 16SrDNA-23SrDNA est un bon moyen d'établissement des relations intraspécifiques. En effet, chaque souche est caractérisée par sa séquence ITS «Internally Transcribed Spacer». Ainsi, ces séquences sont de bons

Tableau VI : caractéristiques phénotypiques et habitat des différentes espèces de Bifidobacterium (Scardovi 1986).

Espèces	Type de muréine	Caractéristiques de fermentation									Morphologie cellulaire	Habitat	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9			
<i>B. bifidum</i>	Orn(Lys) D Ser D-Asp			+								Bâtonnets avec massue	MI ⁺ humaines : adultes et enfants ; veau au pis.
<i>B. longum</i>	Orn(Lys) Ser Ala-Thr-Ala	+	+	+		+	+						MI ⁺ humaines : adultes, enfants. Veau au pis ; eaux stagnantes
<i>B. infantis</i>	Orn(Lys)-Ser- Ala-Thr-Ala	+	-	+	-	-	+	-	-	-			MI ⁺ humaines : enfants ; veau au pis ; eaux stagnantes
<i>B. breve</i>	Lys Gly	+		+	D	D	+	D					MI ⁺ humaines : enfants ; veau au pis ; eaux stagnantes
<i>B. adolescentis</i>	Lys(Orn) D Asp	+	+	+	+	+	+	D	+	+			MI ⁺ humaines : adultes ; rumen bovin ; eaux stagnantes
<i>B. angulatum</i>	Lys(Orn)-D-Asp	+	+	+	-	-	+	D	+	D	Arrangement en pellicule ou en « V »		MI ⁺ humaines : adultes ; eaux stagnantes.
<i>B. catenulatum</i>	Lys(Orn) Ala2 Ser(1,2-1,0)	+	+	+	+		+	+		D	Disposition linéaire d'éléments globulaires		MI ⁺ humaines : adultes et enfants ; eaux stagnantes
<i>B. pseudocatenulatum</i>	Lys(Orn) Ala2 Ser(1,2-1,0)	+	+	+	D		+	D	+	D			MI ⁺ humaines : enfants, veau au pis ; eaux stagnantes
<i>B. dentium</i>	Lys(Orn)-D-Asp	+	+	+	+	+	+	-	+	+			Cavité humaine et cavité orale ; MI ⁺ humaines adultes ; abeilles.
<i>B. globosum</i>	Orn(Lys)-Ala2-3	+	D	+	-	-	+	-	+	-			MI ⁺ de pores, veaux au pis, lapins, agneaux
<i>B. pseudolongum</i>	Orn(Lys)-Ala2-3	+	+	D	D	D	+	-	+	-			MI ⁺ des poulets, veaux, rats et souris
<i>B. cuniculi</i>	Orn(Lys) Ser(Ala)-Ala2		+							+			MI ⁺ de lapins
<i>B. choerinum</i>	Orn(Lys)- Ser(Ala) Ala2	-	-	+	-	-	+	-	+	-			MI ⁺ de pores ; eaux stagnantes.
<i>B. animalis</i>	Orn(Lys)- Ser(Ala) Ala2	+	+	+	D	D	+	-	+	-	Échappement au niveau du milieu du bâtonnet.		MI ⁺ de poulets, rats, lapins, veaux et porcs ; eaux stagnantes.
<i>B. thermophilum</i>	Orn(Lys)-D-Glu	-	-	D	D	D	+	-	+	-			MI ⁺ de pores, poulets et veau au pis ; rumen bovin ; Eaux stagnantes.
<i>B. boum</i>	Lys-D-Ser-D- Glu	-	-	D	-	-	+	-	+	-			MI ⁺ de pores ; rumen bovin.
<i>B. magnum</i>	Lys(Orn) Ala2 Ser(1,2-1,0)	+	+	+			+				Grande dimension des cellules		MI ⁺ de lapin
<i>B. pullorum</i>	Lys(Orn) D Asp	+	+				+				Longues chaînes de cellules régulières		MI ⁺ de poulet
<i>B. suis</i>	Orn(Lys)-Ser- Ala-Thr-Ala	-	+	+	-	-	+	-	-	-			MI ⁺ de pores.
<i>B. minimum</i>	Lys Ser									+	Petite dimension des cellules		Eaux stagnantes.
<i>B. subtile</i>	Lys(Orn) D Asp	+				+	+	+	+	+			Eaux stagnantes
<i>B. corneiforme</i>	Lys(Orn) D Asp	+	+		+		+			+			Intestin de Apis mellifera
<i>B. asteroides</i>	Lys Gly	+	+		+		+				D	Arrangement des cellules en forme d'étoile	Intestin de Apis mellifera
<i>B. indicum</i>	Lys(Orn)-D-Asp	+	-	-	+	-	+	-	-	+			Intestin de Apis cerana et A. dorsata

1. D-Ribose, 2. L-Arabinose, 3. Lactose, 4. Cellobiose, 5. Melezitose, 6. Raffinose, 7. Sorbitol, 8. Amidon, 9. Gluconate

outils pour l'identification des souches. Le taux maximum de divergence entre les souches appartenant à la même espèce est de 13% (Leblond-Bourget *et al.*, 1996).

Méthodes de recherche traditionnelles des bifidobactéries

La détermination de la présence ou de l'absence de souches appartenant à une espèce du genre *Bifidobacterium* par méthodes traditionnelles nécessite en général 3 étapes : la détection, une confirmation de leur appartenance au genre et une identification au niveau de l'espèce.

La détection

Il n'existe pas de méthodes fiables de dénombrement de bifidobactéries à partir d'échantillons polycontaminés. La détermination semi-quantitative est réalisée en effectuant la détection décrite ci-dessous à partir de dilutions successives de la suspension - mère réalisée à partir de l'aliment.

- Enrichissement

Il est nécessaire dans le cas où le taux de bifidobactéries est faible.

Il nécessite le recours à des milieux utilisés sous forme de bouillons le plus souvent enrichis en acide propionique (Beerens, 1990 ; 1991 ; Tableau IV). Après la mise en culture, une incubation en anaérobiose de 18h à 72h selon le type de milieu est requise (Beerens, 1990 ; Nebra et Blanch, 1999). La température de croissance idéale se situe entre 37°C et 39°C selon les espèces de bifidobactéries.

Ces milieux contiennent des substances favorables à la croissance de la plupart des bactéries et ne sont donc en rien sélectifs. Les conditions d'incubation, elles, permettent de ne

sélectionner que les bactéries anaérobies strictes ou facultatives.

- Isolement

Des substances telles que des antibiotiques ou des acides n'ont pas d'effets favorables sur la croissance des bifidobactéries, mais sont limitantes pour la croissance d'autres bactéries (Tableau V ; Silvi *et al.*, 1996 ; Hartemink et Rombouts, 1999). L'ajout de ces substances à des milieux de culture dans des proportions variables permet de réaliser des milieux sélectifs (Beerens, 1990 ; 1991 ; Nebra, 1999).

Leur efficacité n'est cependant pas parfaite. Dans certains cas, des bactéries du genre *Clostridium* ou *Lactobacillus* peuvent encore croître (Beerens, 1990 ; 1991). Une étape de confirmation est donc nécessaire afin de vérifier qu'il s'agit bien de bifidobactéries.

La confirmation du genre *Bifidobacterium*

Le test de confirmation le plus efficace est le test de la fructose-6-phosphate-phospho-kétolase (F6PPK). Cette enzyme est absente chez les bactéries Gram-positives anaérobies ayant une morphologie pseudobifide telles que les *Arthrobacter*, *Propionibacterium*, *Corynebacterium* et *Actinomyces* et est donc un bon élément de différenciation étant donné que toutes les espèces du genre *Bifidobacterium*, elles, possèdent l'enzyme. La réaction catalysée par cette enzyme est représentée par la figure 4 (Scardovi et Trovatelli, 1965 ; Gavini *et al.*, 1996).

La formation d'acétyl-P à partir de fructose-6-P est visualisée par la formation d'une couleur violette

(absorption maximum à 505 nm) due à la chélation du fer de la molécule $FeCl_3 \cdot 6H_2O$. C'est un test facile à réaliser, qui permet une bonne identification finale des bifidobactéries en culture pure.

L'identification au niveau de l'espèce du *Bifidobacterium*

Après avoir confirmé le genre *Bifidobacterium*, une identification de l'espèce du genre *Bifidobacterium* d'après ses caractéristiques phénotypiques est possible (Tableau VI). Il existe aussi un système d'identification numérique développé sur Internet (<http://kounou.lille.inra.fr>) qui, à l'aide des galeries API 50CH et ID32A (BioMérieux, France), permet l'identification de 7 espèces d'origine humaine et de 4 espèces d'origine animale.

CONCLUSION

Les méthodes traditionnelles nécessitent beaucoup d'énergie tant pour la détection que pour l'identification. Or, pour travailler sur une chaîne de production alimentaire, des résultats rapides sont indispensables afin de ne pas bloquer inutilement des lots dans les entreprises de transformation de viande ou de produits laitiers.

De plus, la succession de différentes étapes et leur non automatisation est très coûteuse et ne fournit, au mieux, que des données semi-quantitatives. Le recours aux outils de la biologie moléculaire permettrait de simplifier les manipulations, de les automatiser et de les standardiser. Cela permettrait donc de faire de sérieuses économies.

Enfin, l'évolution des techniques permettrait d'augmenter la sensibilité

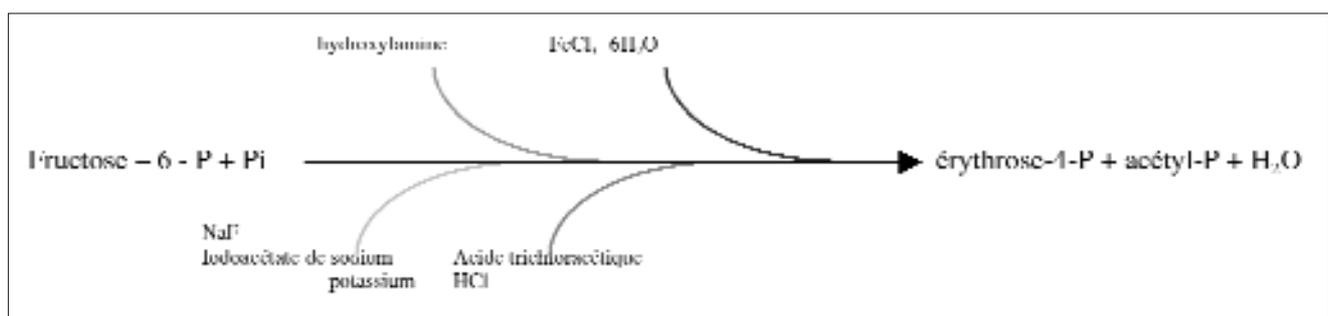


Figure 4 : Le test de la F6PPK (fructose-6-phosphokétolase).

La présence de l'enzyme est mise en évidence par l'apparition d'une couleur violette après la chélation du $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (Scardovi et Trovatelli, 1965 ; Gavini *et al.*, 1996)

et la spécificité des tests, d'obtenir des données réellement quantitatives et ainsi de répondre à des questions fondamentales exprimables aujourd'hui, à savoir :

- Le genre *Bifidobacterium* est-il le meilleur indicateur de contamination fécale ;
- Les espèces différentes retrouvées chez les animaux et chez l'homme sont-elles strictement inféodées à ces hôtes ou sont-elles seulement dominantes dans leurs intestins ;
- Quelle est la stratégie optimale pour détecter l'origine de la contamination fécale ?
- Quels critères microbiologiques utiliser dans la législation ou pour vérifier l'efficacité des plans de maîtrise (HACCP) dans le secteur alimentaire ?

Proposal for a new standard of faecal contamination indicator: *Bifidobacterium*

SUMMARY

Micro-organisms of the genus *Bifidobacterium* are some of the most common micro-organisms in the human and animal intestinal tract. *Bifidobacterium* species are well known for their beneficial effects on the microflora. In this article, the interest for this micro-organism is other. If this micro-organism is found at different stages of the processing line, it indicates often a contamination of this processing line. An other characteristic is that *Bifidobacterium* species are different according to

the host. It could be possible to determine the contamination origin (human or animal). That is an advantage over other bacteria such as the actual faecal contamination indicator, *Escherichia coli*.

The aim of this project is to develop a test, using molecular genetic tools, to rapidly detect the most important *Bifidobacterium* species in food. If we know the contamination sources, the critical points will be pointed out and the control measures will be better.

BIBLIOGRAPHIE

- BEERENS H. An elective and selective isolation medium for *Bifidobacterium* spp. *Lett. Appl. Microbiol.*, 1990, **11**, 155-157.
- BEERENS H. Detection of bifidobacteria by Using Propionic Acid as a Selective Agent. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1991, **8**, 2418-2419.
- BEERENS H., GAVINI F., NEUT C. Effect of exposure to air on 84 strains of Bifidobacteria. *Anaerobe*, 2000, **6**, 65-67.
- BEZKOROVAINY A., TOPOUZIAN N. The effect of metal chelators and other metabolic inhibitors on the growth of *B. bifidum* var. penn. *Clin. Biochem.*, 1981, **14**, 135-141.
- BEZKOROVAINY A., TOPOUZIAN N. The effects of metabolic inhibitors on the metabolism of *B. bifidum* var. penn. *Med. Sci.*, 1982, **10**, 239.
- BEZKOROVAINY A., TOPOUZIAN N. Aspects of iron metabolism in *B. bifidum* var. penn. *Int. J. Biochem.*, 1983, **15**, 361-366.
- BEZKOROVAINY A. Iron uptake by the microaerophilic anaerobe *Bifidobacterium bifidum* var. pennsylvanicus. *Clin. Physiol. Biochem.*, 1984, **2**, 291.
- BEZKOROVAINY A., TOPOUZIAN N., MILLER-CATCHPOLE R. Mechanisms of ferric and ferrous iron uptake by *Bifidobacterium bifidum* var. pennsylvanicus. *Clin. Physiol. Biochem.*, 1986, **4**, 150-158.
- BIAVATI B., VESCOVO M., TORRIANI S., BOTTAZZI V. Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Ann. Microbiol.*, 2000, **50**, 117-131.
- BRIGIDI P., VITALI B., SWENNEN E., ALTOMARE L., ROSSI M., MATTEUZZI D. Specific Detection of *Bifidobacterium* Strains in a Pharmaceutical Probiotic Product and in Human Feces by polymerase chain reaction. *Syst. Appl. Microbiol.*, 2000, **23**, 391-399.
- CATSARAS. M : Les indices de contamination fécale. In : Bourgeois C.M, Leveau J. Y., Techniques d'analyses et de contrôle dans les industries agro-alimentaires. Lavoisier-Tec et Doc : Paris, 1991, 247-259.
- CHARTERIS W., DELLY P., MORELLI L., COLLINS J. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Bifidobacterium* isolates from the human gastrointestinal tract. *Lett. Appl. Microbiol.*, 1998, **26**, 333-337.
- CIVEN R., VÄISÄNEN, M., FINEGOLD S. Peritonsillar abscess, retropharyngeal abscess, mediastinitis, and non-clostridial anaerobic myonecrosis : a case report. *Clin. Infect. Dis.*, 1993, **16**, S299-S303.
- CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, CAC-RCP 021-1979 Code d'usage international recommandé en matière d'hygiène pour les aliments destinés aux nourrissons et enfants en bas âge (y compris les spécifications microbiologiques et les méthodes d'analyse) (14 décembre 2001) (en ligne) adresse URL : http://www.codexalimentarius.net/STANDARD/volume4/vol4_F.htm. Consulté le 09/04/2002.
- CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, CAC/GL 021-1997 Principes régissant l'établissement et l'application de critères microbiologiques pour les aliments (en ligne) Adresse URL : http://www.codexalimentarius.net/STANDARD/vol1b/vol1b_F.htm. Consulté le 09/04/2002.
- CROCIANI F., MATTEUZZI D. Urease activity in the genus *Bifidobacterium*. *Ann. Microbiol.*, 1982, **133**, 417-423.
- CROCIANI F., BIAVATI B., ALESSANDRINI A., CHIARINI C., SCARDOVI V. *Bifidobacterium inopinatum* sp. nov. and *Bifidobacterium denticolens* sp. nov., two new species isolated from human dental caries. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1996, **46**, 564-571.

- DEGUCHI Y., MORISHITA T., MUTAL M. Comparative studies on synthesis of water soluble vitamins among human species of Bifidobacteria. *Agr. Biol. Chem.*, 1985, **49** : 13-19.
- DE VRIES W., STOUTHAMER A. H. Pathway of glucose fermentation in relation to the taxonomy of bifidobacteria. *J. Bacteriol.*, 1967, **93**, 574-576.
- DIRECTIVE 92/46/CEE du conseil, du 16 juin 1992, arrêtant les règles sanitaires pour la production et la mise sur le marché de lait cru, de lait traité thermiquement et de produits à base de lait.
- DIRECTIVE 94/65/CE du conseil, du 14 décembre 1994, établissant les exigences applicables à la production et à la mise sur le marché de viandes hachées et de préparations de viandes.
- GAVINI F., VAN ESBROECK M., TOUZEL J. P., FOURMENT A., GOOSSENS H. Detection of Fructose-6-phosphate Phosphoketolase (F6PPK), a Key Enzyme of the Bifid-Shunt, in *Gardnerella vaginalis*. *Anaerobe*, **2**, 1996, 191-193.
- GELINAS P. Répertoire des microorganismes pathogènes transmis par les aliments. Edisem : Saint-Hyacinthe, 1995, 1-33.
- HA G., YANG C., KIM H., CHONG Y. Case of sepsis caused by *Bifidobacterium longum*. *J. clin. Microbiol.*, 1999, **37**, 1227-1228.
- HARTEMINK R., ROMBOUTS F. Comparison of media for the detection of bifidobacteria, lactobacilli and total anaerobes from faecal samples. *J. Microbiol. Methods*, 1999, **36**, 181-192.
- HOLLAND D. Generic index of the commoner forms of bacteria. *J. Bacteriol.*, 1920, **5**, 191-229.
- JANSEN G., WILDEBOER-VELOO A., TONK R., FRANKS A., WELLING G. Development and validation of an automated, microscopy-based method for enumeration of groups of intestinal bacteria. *J. Microbiol. Methods*, 1999, **37**, 215-221.
- JIAN W., ZHU L., DONG X. New approach to phylogenetic analysis of the genus *Bifidobacterium* based on partial HSP60 gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2001, **51**, 1633-1638.
- JOUVE J., Critères microbiologiques : utilisation et limites In : Sutra L., Federighi M.,
Manuel de Bactériologie Alimentaire. Polytechnica : Paris, 1998, 1-10.
- KLEIN G., PACK A., BONAPARTE C., REUTER G. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 1998, **43**, 103-125.
- KULLEN M., AMANN M., O'SHAUGHNESSY M., O'SULLIVAN D., BUSTA F., BRADY L. Differentiation of Ingested and Endogenous Bifidobacteria by DNA Fingerprinting Demonstrates the Survival of an Unmodified strain in the gastrointestinal Tract of Humans. *J. Nutr.*, 1997, **127**, 89-94.
- LEBLOND-BOURGET N., PHILIPPE H., MANGIN I., DECARIS B. 16S rRNA and 16S to 23S internal transcribed spacer sequence analyses reveal inter- and intraspecific *Bifidobacterium* phylogeny. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1996, **46**, 102-111.
- LECLERCQ A., WANEGUE C., BAYLAC P. Comparison of fecal coliform agar and violet red bile lactose agar for fecal coliform enumeration in foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 2002, 1631-1638.
- LIM K., HUH C., BACK Y. Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria. *J. Dairy Sci.*, 1993, **76**, 2168-2174.
- MATTEUZZI D., CROCIANI F., EMALDI O. Amino Acids produced by bifidobacteria and some clostridia. *Ann. Microbiol.*, 1978, **129 B**, 175-181.
- MATTEUZZI D., BRIGIDI P., ROSSI M., DI D. Characterization and molecular cloning of *Bifidobacterium longum* cryptic plasmid pMB1. *Lett. Appl. Microbiol.*, 1990, **11**, 220-223.
- MANGIN I., BOURGET N., DECARIS B. Ribosomal DNA polymorphism in the genus *Bifidobacterium*. *Res. Microbiol.*, 1996, **147**, 183-192.
- MANGIN I., BOUHNİK Y., BISETTI N., DESCARIS B. Molecular monitoring of human intestinal *Bifidobacterium* strain diversity. *Res. Microbiol.*, 1999, **150**, 343-350.
- MIYAKE T., WATANABE K., WATANABE T., OYAIZU H. Phylogenetic analysis of the genus *Bifidobacterium* and related genera based on 16S rDNA sequences. *Microbiol. Immunol.*, 1998, **42**, 661-667.
- MODLER H. Bifidogenic factors-sources, metabolism and applications. *Int. Dairy J.*, 1997, **4**, 383-407.
- NEBRA Y., BLANCH R. A new selective Medium for *Bifidobacterium* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, **65**, 5173-5176.
- NEUT C., ROMOND C., BEERENS H. Identification des *Bifidobacterium* en fonction de leurs besoins nutritionnels. *Rev. Inst. Pasteur Lyon*, 1981, **14**, 19-26.
- OP DEN CAMP H., VEERKAMP J., OOSTERHOF A., CAN HAL BEEK H. Structure of the lipoteichoic acids from *B. bifidum* spp. *Penn. Biochim. Biophys. Acta*, 1985, **795**, 301-313.
- ORLA-JENSEN S. La classification des bactéries lactiques. *Lait*, 1924, **4**, 468-474.
- PARK M., SHIN D., LEE K., JI G. Sequence analysis of plasmid pKJ50 from *Bifidobacterium longum*. *Microbiology*, 1999, **145**, 585-592.
- PREVOT A., TURPIN A., KAISER P. Sous-genre : *Bifidobacterium*. In : Prevot A.R., Turpin A., Kaiser P., Les bactéries anaérobies. Editions Dunod : Paris, 1967, 1840-1878.
- RADA V., DLEBAL J. Susceptibility of Bifidobacteria to nisin. *Lett. Appl. Microbiol.*, 1998, **26**, 123-125.
- REUTER G. Vergleichende Untersuchungen über die Bifidus-Flora im Säuglings und Erwachsenenstuhl. *Zentralbl. Bakteriol. (orig. A)*, 1963, **191**, 486-507.
- ROBERTS A., CHERICI R., SAWATZKI G., HILL M., VOLPATO S., VIGI V. Supplementation of an adapted formula with bovine lactoferrin : 1. Effect on the infant faecal flora. *Acta Paediatr.*, 1992, **81**, 119-124.

- ROGOSA M. Genus III, *Bifidobacterium* Orla-Jensen. In : Buchanan R., Gibbons N., Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th edn., 1974, Williams and Wilkins : Baltimore, 669-676.
- ROSSI M., BRIGIDI P., GONZALEZ VARA Y RODRIGUEZ A., MATTEUZI D. Characterization of the plasmid pMB1 from *Bifidobacterium longum* and its use for shuttle vector construction. Res. Microbiol., 1996, **147**, 133-143.
- SCARDOVI V., TROVATELLI L. The fructose-6-phosphate shunt as peculiar pattern of hexose degradation in the genus *Bifidobacterium*. Ann. Microbiol., 1965, **15**, 19-29.
- SCARDOVI V. Genus *Bifidobacterium*, In : Sneath P., Mair N., Sharpe M., Holt J. Bergey's manual of Systematic Bacteriology (volume 2), Williams and Wilkins : Baltimore, 1986, 1418-1434.
- SGORBATI B., SCARDOVI V., LEBLANC D. Plasmids in the genus *Bifidobacterium*. J. Gen. Microbiol., 1982, **128**, 2121- 2131.
- SGORBATI B., SMILEY M., SOZZI T. Plasmids and phages in *B. longum*. Microbiologica., 1983, **6**, 169-173.
- SGORBATI B., SCARDOVI V., LEBLANC D. Related structures in the plasmid profiles of *B. longum*. Microbiologica. 1986, **9**, 415-422.
- SILVI S., RUMNEY C., ROWLAND I. An assessment of three selective media for bifidobacteria in faeces. J. Appl. Bacteriol., 1996, **81**, 561-564.
- TAKAHIRO M., KOICHI W., RYUICHIRO T., MASA-FUMI F., HIROSHI O. Distribution of Bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers. Appl. Environ. Microbiol., 1999, **65**, 4506-4512.
- UEDA M., NOKAMOTO S., NAKAI R., TAGAGI A. Establishment of a defined minimal medium and isolation of auxotrophic mutants for *B. bifidum* ES5. J. Gen. Appl. Microbiol., 1983, **29**, 103-114.
- VEERKAMP J. Effects of growth conditions on the lipid composition of *Bifidobacterium bifidum* subsp. Pennsylvanicum. J. Microbiol. Serol., 1977, **43**, 101-110.
- VEERKAMP J. Catabolism of glucose and derivatives of 2 deoxy-2-amino-glucose in *Bifidobacterium bifidum* subsp. Pennsylvanicum. Arch. Biochem. Biophys., 1978, **129**, 257-263.
- VENKETESHWER RAO A., SHIWNARAIN N., KOO M., JENKINS D. Effect of fiber-rich foods on the composition of intestinal microflora. Nutr. Res., 1994, **14**, 523-535.
- VINDEROLA C., BAILO N., REINHEIMER J. Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage. Food Res. Int., 2000, **33**, 97-102.
- WINSLOW C., BROADHURST J., BUCHANAN R., KRUMWIEDE C., ROGERS L., SMITH G. The families and genera of the bacteria. Preliminary report of the Committee of the Society of American Bacteriologists on Characterization and Classification of Bacterial types. J. Bacteriol., 1917, **2**, 505-566.