

Résumé de thèse de doctorat

Développement d'outils moléculaires de détection des bifidobactéries dans les aliments et évaluation de leur intérêt comme organismes indicateurs de contamination fécale

Development of molecular tools to detect bifidobacteria in food and evaluation of their interest as indicator organisms of fecal contamination

CANDIDAT : Véronique DELCENSERIE

PROMOTEUR : Professeur G. DAUBE

Département et Service

Département des Sciences des Denrées alimentaires, Secteur de microbiologie, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Belgique

Date de la défense publique : 19 mai 2004

Composition du Jury

• MEMBRES EXTÉRIEURS À LA FACULTÉ :

Professeur L. De Zutter, Universiteit Gent, Belgique

Docteur F. Gavini, INRA, France

Docteur D. Roy, Université Laval, Québec, Canada

• MEMBRES INTERNES À LA FACULTÉ DE MÉDECINE VÉTÉRINAIRE :

Professeur A. Clinquart, Professeur G. Daube, Professeur Ch. Hanzen, Professeur J. Mainil, Professeur H. Vindevogel, Docteur M. Diez, Docteur L. Grobet

DESCRIPTION DU SUJET DE RECHERCHE ABORDÉ

Les bifidobactéries sont des bactéries Gram-positives, immobiles, non-sporulantes. Elles ont été considérées comme anaérobies strictes jusqu'à ce qu'une espèce soit définie comme aéro-anaérobie (Simpson *et al.*, 2004). Elles font partie de la flore intestinale normale des humains et animaux et sont généralement des bactéries non-pathogènes.

Le genre *Bifidobacterium* a été proposé comme indicateur de contamination fécale parce qu'il représente un des groupes bactériens les plus importants dans les matières fécales humaines et animales (Matsuki *et al.*, 1998 ;

1999). De plus, comme les espèces de bifidobactéries dominantes sont différentes chez l'homme et les animaux (Gavini *et al.*, 1991), il peut être possible de déterminer l'origine humaine ou animale de la contamination. Les bifidobactéries ont été récemment proposées comme indicateurs de contamination fécale dans l'eau (Lynch *et al.*, 2002 ; Gilpin *et al.*, 2003 ; Nebra *et al.*, 2003) ainsi que dans les produits à base de viande et à base de lait cru (Beerens, 1998 ; Gavini and Beerens, 1999 ; Beerens *et al.*, 2000).

De nombreuses méthodes de culture ont été décrites pour ces applications mais aussi pour d'autres telles que la connaissance du genre *Bifidobacterium* et son évolution dans

la flore intestinale (Martineau, 1999 ; Rada et Petr, 2000 ; Petr et Rada, 2001) et l'usage des bifidobactéries comme probiotiques dans certains aliments et produits pharmaceutiques (Pacher et Kneifel, 1996 ; Nebra et Blanch, 1999 ; Payne *et al.*, 1999). L'usage d'agents sélectifs tels que l'acide propionique (Beerens, 1990) ou la paromomycine (Beerens, 1998) a été décrit dans plusieurs milieux de culture. Cependant, ces agents ne sont pas suffisamment efficaces pour la détection des bifidobactéries à partir de produits à base de viande et de lait cru. L'élimination de la flore contaminante comme les lactobacilli dans le lait cru ou les *Clostridium* dans les échantillons de viande est insuffisante.

Plusieurs méthodes moléculaires palliant à ces inconvénients ont récemment été décrites. Parmi les plus récentes, les méthodes suivantes peuvent être citées : PCR-Elisa (Malinen *et al.*, 2003), PFGE (*pulsed-field gel electrophoresis*) et PCR basée sur le 16S rRNA (Roy *et al.*, 1996 ; Bonjoch *et al.*, 2004); PCR/DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis*) ciblant le gène *transaldolase* et identifiant et dénombrant les bifidobactéries d'origine humaine (Requena *et al.*, 2002); PCR/RFLP basées sur le 16S rRNA pour détecter les principales espèces d'origine humaine (Roy et Sirois, 2000) et de la PCR en temps réel (Requena *et al.*, 2002).

En collaboration avec l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) en France et l'*Institute of Meat Hygiene, Meat Technology and Food Science* de la Faculté de Médecine Vétérinaire de Vienne en Autriche, nous avons évalué la possibilité d'utiliser le genre *Bifidobacterium* comme indicateur de contamination fécale dans le lait cru et les fromages au lait cru ainsi que les viandes et les produits à base de viande.

RÉSULTATS

Trois méthodes de détection des principales espèces de bifidobactéries ont été développées et testées. Une méthode de culture conventionnelle utilisant la mupirocine comme agent sélectif et deux méthodes moléculaires basées respectivement sur les gènes ADNr 16S et *hsp60*.

La méthode de culture est composée de deux étapes : une étape d'enrichissement et une étape d'isolement. La composition des milieux d'enrichissement et d'isolement sans addition de mupirocine a été décrite par Beerens (1998). L'étape d'enrichissement utilise le milieu Brain Heart Infusion (BHI) supplémenté avec de l'acide propionique, du citrate de fer, des extraits de levure et enfin, de la mupirocine. L'étape d'isolement utilise le milieu Colombia Blood Agar supplémenté lui aussi avec de la mupirocine.

La première méthode moléculaire est une PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) et a été développée sur le gène ADNr 16S. Cette méthode a été testée avec succès sur 64 souches pures de bifidobactéries appartenant à 13 espèces

différentes (Delcenserie *et al.*, 2004). Après amplification d'un fragment de 1050 pb environ à l'aide d'amorces spécifiques du genre *Bifidobacterium* (16S direct : 5'-aat agc tcc tgg aaa cgg gt-3' et 16S reverse : 5-cgt aag ggg cat gat gat ct-3'), le produit de PCR est digéré par chaque enzyme de restriction (*AluI* et *TaqI*) donnant ainsi l'apparition de différents profils. Cette méthode permet de différencier facilement les espèces ou groupes d'espèces d'origine humaine de celles ou ceux d'origine animale avec l'utilisation de seulement deux enzymes de restriction (Delcenserie *et al.*, 2004).

La deuxième méthode moléculaire est une PCR (Delcenserie *et al.*, 2005) ciblant cette fois le gène *hsp60*, étudié également par d'autres auteurs (Jian *et al.*, 2001 ; Jian et Dong, 2002). Cette méthode a été développée à l'aide d'amorces dégénérées spécifiques du genre *Bifidobacterium*. Le genre *Bifidobacterium* est identifié par l'amplification d'un fragment de 217 pb du gène *hsp60*. La paire d'amorces (B11up : 5'-gts cay gar ggy cts aag aa-3' et B12dwn : 5'-cct tcc tgg ccr acc ttg t-3') a été testée pour sa spécificité et sa sensibilité sur 128 souches pures. Comme les aliments peuvent constituer des matrices difficiles pour des tests de PCR à cause de la présence de nombreux inhibiteurs, un contrôle interne a été construit. Il s'agit d'un fragment d'ADN de 315 pb créé artificiellement et amplifié dans les mêmes conditions de PCR que celle réalisée sur le gène *hsp60*. En fonction des résultats obtenus avec la PCR-RFLP, une sonde a ensuite été choisie afin de pouvoir réaliser de la PCR en temps réel sur le gène *hsp60*.

Ces trois méthodes ont été utilisées pour analyser des échantillons appartenant à une filière de production de fromage au lait cru : du lait jusqu'au fromage au 21^{ème} jour d'affinage ; et des échantillons provenant d'une filière de production de viande de mouton : de l'abattoir jusqu'à la vente au détail.

La méthode de culture a été comparée à la méthode PCR sur le gène *hsp60*, sur 148 échantillons de lait cru et 100 échantillons prélevés à 4 stades de production d'une filière de fromages au lait cru (A : lait cru, B : lait après addition de présure (J1), C : démouillage (J2), D : affinage (J21)). Les résultats ont montré que la sensibilité des 2 méthodes était bonne (plus de 95 % d'échantillons positifs) avec une

meilleure sensibilité de la PCR pour les échantillons de fromage au lait cru ($\chi^2 = 20,04$; $p < 0,0005$). Les dénombrements moyens de bifidobactéries augmentent de manière significative ($F = 14,4$; $p < 0,0005$) de l'étape A à l'étape D en analysant les valeurs les plus hautes obtenues soit par PCR, soit par méthode conventionnelle en culture.

Une identification des principales espèces a été réalisée par PCR-RFLP et par PCR en temps réel (Delcenserie, manuscrit en préparation) sur 176 échantillons de fromage au lait cru à 4 stades de production (A, B, C et D). Sur les 176 échantillons analysés, 135 (77 %) contenaient l'espèce *B. pseudolongum*. Ces résultats étaient en corrélation avec ceux obtenus par PCR en temps réel : 120 échantillons positifs (68 %) pour l'espèce *B. pseudolongum*. Les dénombrements semi-quantitatifs ont été comparés aux 4 stades de production (A, B, C, D). Il est intéressant de noter que les dénombrements de *B. pseudolongum* restent stables tout au long de la production ($\log \text{cfu ml}^{-1}$; A, $2,3 \pm 1,2$; B, $1,8 \pm 1,4$; C, $2,2 \pm 1,5$; D, $1,9 \pm 1,4$). La comparaison entre *B. pseudolongum* et *E. coli* montre que les dénombrements semi-quantitatifs de *B. pseudolongum* sont significativement plus élevés que ceux d'*E. coli*.

Concernant la filière de production de viande de mouton, 244 échantillons prélevés tout au long d'une chaîne de production de viande de mouton (de l'abattoir jusqu'aux points de vente au détail) ont été analysés par méthode de culture, PCR-RFLP sur le gène ADNr 16S et par PCR sur le gène *hsp60*. Les espèces *B. pseudolongum* et *B. thermophilum* ont été identifiées suggérant, comme dans les échantillons de fromage, une contamination exclusivement d'origine animale. Les résultats semi-quantitatifs obtenus pour le genre *Bifidobacterium* ont été comparés aux dénombrements d'*E. coli*. Sur l'ensemble des résultats, les bifidobactéries étaient sensiblement plus élevées.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le but de notre étude était de répondre aux questions suivantes : Est-ce que les bifidobactéries en tant qu'indicateurs peuvent être détectées à l'aide de méthodes simples et rapides ? Est-il

possible d'identifier l'origine de la contamination ? Est-ce un indicateur aussi sensible ou plus sensible qu'*E. coli* ?

Est-ce que cet indicateur peut être détecté à l'aide de méthodes simples et rapides ?

La PCR ciblant le gène *hsp60* a été comparée à la méthode de culture sur la filière de production de fromage au lait cru et sur la filière de production de viande de mouton. Les résultats globaux observés avec la PCR développée sur le gène *hsp60* démontrent que cette méthode est plus sensible que la méthode de culture et beaucoup plus rapide. Une étape d'enrichissement de 72 h avant l'analyse des échantillons par PCR est cependant nécessaire. Des tests ont été réalisés afin de réduire la durée d'incubation à 48h et même 24 h. Un court enrichissement reste cependant nécessaire.

Est-il possible d'identifier l'origine de la contamination ?

Lynch et collaborateurs (2002), Nebra et collaborateurs (2003) et Bonjoch et collaborateurs (2004) ont proposé les espèces *B. adolescentis* ou *B. dentium* comme indicateurs de la contamination fécale. Comme ces espèces sont dominantes dans les matières fécales humaines, elles indiquent une contamination d'origine humaine. De plus, Rhodes et Kator (1999) ont dénombré les bifidobactéries sorbitol-positives afin d'identifier une pollution d'origine humaine dans des eaux polluées. Cependant, dans le lait cru, la principale contamination semble être d'origine animale comme en atteste l'étude de Beerens et collaborateurs (2000) et pourrait être représentée par *B. pseudolongum*, retrouvée à la fois dans le lait et les matières fécales des ruminants. Dès lors, en industrie alimentaire, il semble important de définir l'origine humaine et animale de la contamination.

Deux méthodes ont été testées pour identifier l'origine de la contamination : la PCR-RFLP et la PCR en temps réel.

La PCR-RFLP est une méthode facile, reproductible, ayant déjà été décrite pour la détection des bifidobactéries (Mangin *et al.*, 1996 ; Kullen *et al.*, 1997 ; Roy et Sirois, 2000 ; Ventura and Zink ; 2003). Nous avons mis au point une PCR-RFLP sur le gène 16S

rDNA à l'aide de 2 enzymes de restriction, *AluI* et *TaqI*. Une étude réalisée sur des souches pures de bifidobactéries a pu démontrer que les espèces d'origine humaine pouvaient être différenciées de celles d'origine animale par cette méthode (Delcenserie *et al.*, 2004).

Concernant les échantillons de la filière de production de viande de mouton, trois principaux profils de restrictions étaient observés dans les échantillons. Un des profils correspondait à l'espèce *B. pseudolongum* tandis que les 2 autres correspondaient à *B. thermophilum* ou *B. choerinum*. Il est intéressant de noter que l'un de ces deux profils n'est présent que dans les échantillons, provenant de l'atelier de découpe. Ce profil correspondrait donc à une espèce ou souche de bifidobactéries présente uniquement dans l'environnement de découpe. Cette espèce, ou souche, pourrait provenir d'un autre hôte que le mouton.

Concernant les échantillons de la filière de production de fromage au lait cru, un profil principal a été observé. Selon l'étude réalisée sur les souches pures de bifidobactéries, ce profil correspondrait à l'espèce *B. pseudolongum*.

La PCR en temps réel a été développée sur la PCR déjà établie sur le gène *hsp60*. Une sonde spécifique de l'espèce *B. pseudolongum* a été testée. Cette méthode a été comparée à la PCR-RFLP pour la détection de ces deux groupes. La PCR-RFLP était statistiquement plus sensible que la PCR en temps réel. La PCR-RFLP est une méthode très efficace pour la recherche de l'origine, humaine ou animale de la contamination. Cette méthode nous a permis de montrer, le long de la chaîne de production de fromage au lait cru, que la principale contamination par les bifidobactéries était d'origine animale avec un grand taux de détection de *B. pseudolongum*. Aucune contamination d'origine humaine n'a été détectée. Ceci est en accord avec les observations précédentes de Beerens et collaborateurs (2000) montrant une contamination d'origine animale dans le lait cru, provenant sans doute des matières fécales des vaches puisque cette même espèce avait été isolée dans les deux types d'échantillons. Cependant, bien qu'efficace, la PCR-RFLP est moins applicable en routine et surtout, moins rapide que la PCR en temps réel. C'est pourquoi la PCR en temps réel a été

développée pour la recherche de l'espèce *B. pseudolongum*.

Il est intéressant de noter que l'espèce *B. pseudolongum*, d'origine animale, reste stable tout au long du processus, de l'étape A (lait cru) à l'étape D (affinage, jour 21), et peut donc être utilisée comme indicateurs de contamination pour la filière de production de fromage au lait cru

Est-ce un indicateur aussi sensible ou plus sensible qu'*E. coli* ?

Dans la filière de production de fromage au lait cru, la comparaison de *B. pseudolongum* et *E. coli* a montré que les dénombrements semi-quantitatifs de bifidobactéries étaient toujours plus élevés que ceux d'*E. coli*. Il en était de même dans la filière de production de viande de mouton, toute étape de production confondue. En considérant chaque étape, la différence n'était significative que pour les échantillons prélevés sur les carcasses, échantillons les plus fortement contaminés.

Nous pouvons donner les réponses suivantes aux questions initialement posées :

1. Cet indicateur peut être détecté par une méthode rapide, même si une étape d'enrichissement de 72h reste pour l'instant nécessaire. La PCR en temps réel ciblant le gène *hsp60* semble être la méthode de choix pour une application en routine car bien qu'efficace, la PCR-RFLP est moins pratique et moins rapide que la PCR en temps réel. En fonction de la limite de détection établie pour les bifidobactéries dans les aliments, une réduction, voire une suppression de la période d'enrichissement pourrait être possible.
2. L'espèce *B. pseudolongum* a été choisie comme indicateur de contamination car il s'agit de l'espèce retrouvée le plus fréquemment dans les échantillons de fromage au lait cru et de viandes provenant des entreprises étudiées. Cette espèce met en évidence une contamination d'origine animale. Cependant, une contamination accidentelle d'origine humaine est toujours possible. Des espèces d'origine humaine devraient donc être recherchées également. Ceci est déjà possible via la méthode PCR-RFLP. Une sonde utilisable

par PCR en temps réel devrait par contre être développée.

3. Comme indicateur dans le lait cru, *B. pseudolongum* est plus intéressant à utiliser qu'*E. coli* car, non seulement, les dénombrements d'*E. coli* diminuent durant le processus en présence d'un pH bas tandis que ceux de *B. pseudolongum* restent stables; mais en plus, *B. pseudolongum* est présent en plus grand nombre. Le faible nombre d'échantillons contenant des bifidobactéries dans les échantillons prélevés sur la filière de production de viande de mouton n'a pas permis de voir si les bifidobactéries sont ou non, plus intéressantes à utiliser qu'*E. coli*.

La prochaine étape sera de définir un seuil acceptable de bifidobactéries dans les échantillons de fromage au lait cru. Plus d'études doivent être réalisées sur des échantillons en provenance de la filière viande avant de définir un taux acceptable de bifidobactéries. En fonction de ce seuil, l'étape d'enrichissement pourrait être réduite, ou même supprimée. Cela pourrait permettre d'exploiter au maximum les possibilités offertes par la PCR en temps réel, dont une estimation possible du taux initial de contamination d'un échantillon par les bifidobactéries.

C'est l'espèce *B. pseudolongum* qui a été choisie comme indicateur de contamination fécale d'origine animale.

Dans les échantillons de viande, il serait cependant nécessaire de vérifier si l'espèce *B. thermophilum* ne doit pas non plus être recherchée. Enfin, une contamination accidentelle d'origine humaine est toujours possible. Des espèces d'origine humaine devraient donc être recherchées également.

Remerciements

Ce travail a été possible grâce à un financement européen (Contract number : QLK1-CT-2000-00805).

RÉFÉRENCES

- BEERENS H. An elective and selective isolation medium for *Bifidobacterium* spp. *Let. Appl. Microbiol.*, 1990, **11**, 155-157.
- BEERENS H. Bifidobacteria as indicators of faecal contamination in meat and meat products. Detection, determination of origin and comparison with *Escherichia coli*. *Int. J. Food Microbiol.*, 1998, **40**, 203-207.
- BEERENS H., HASS BRAC DE LA PERRIERE B., GAVINI F. Evaluation of the hygienic quality of raw milk based on the presence of bifidobacteria : the cow as a source of faecal contamination. *Int. J. Food Microbiol.*, 2000, **54**, 163-169.
- BONJOCH X., BALLESTE E., BLANCH A. Multiplex PCR with 16S rRNA gene-targeted primers of *Bifidobacterium* spp. to identify sources of fecal pollution. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004, **70**, 3171-3175.
- DELCENSERIE V., BECHOUX N., LEONARD T., CHINA B., DAUBE G. Discrimination between *Bifidobacterium* species from human and animal origin by PCR-Restriction fragment length polymorphism. *J. Food Prot.*, 2004, **67**, 1284-1288.
- DELCENSERIE V. BECHOUX N., CHINA B., DAUBE G., GAVINI F. A PCR method for detection of bifidobacteria in raw milk and raw milk cheese: comparison with culture-based methods. *J. Microbiol. Methods*, 2005, **61**, 55-67.
- GAVINI F., BEERENS H. Origin and identification of bifidobacteria strains isolated from meat and meat products. *Int. J. Food Microbiol.*, 1999, **46**, 81-85.
- GAVINI F., POURCHER A. M., NEUT C., MONGET D., ROMOND C., OGER C., IZARD D. Phenotypic differentiation of bifidobacteria of human and animal origins. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1991, **41**, 548-557.
- GILPIN B., JAMES T., NOUROZI F., SAUNDERS D., SCHOLES P., SAVILL M. The use of chemical and molecular microbial indicators for faecal source identification. *Water Sci. Technol.*, 2003, **47**, 39-43.
- 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.
- JIAN W., DONG X. Amplification of bacterial heat shock protein 60 gene using inverse PCR method. *Wei Sheng Wu Xue Bao.*, 2002, **42**, 56-61.
- KULLEN M.J., BRADY L.J., O'SULLIVAN D.J. Evaluation of using a short region of the *recA* gene for rapid and sensitive speciation of dominant bifidobacteria in the human large intestine. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1997, **154**, 377-383.
- LYNCH P., GILPIN B., SINTON L., SAVILL M. The detection of *Bifidobacterium adolescentis* by colony hybridization as an indicator of human faecal pollution. *J. Appl. Microbiol.*, 2002, **92**, 526-533.
- MALINEN E., MATTO J., SALMITIE M., ALANDER M., SAARELA M., PALVA A. PCR-ELISA II: Analysis of *Bifidobacterium* populations in human faecal samples from a consumption trial with *Bifidobacterium lactis* Bb-12 and a galacto-oligosaccharide preparation. *Syst. Appl. Microbiol.*, 2002, **25**, 249-258. Erratum in: *Syst. Appl. Microbiol.*, 2003, **26**, 154-155.
- MARTINEAU B. Comparison of four media for the selection of bifidobacteria in dog fecal samples. *Anaerobe*, 1999, **5**, 123-127.
- MATSUKI T., WATANABE K., TANAKA R., FUKUDA M., OYAZU H. Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, **65**, 4506-12.

- MATSUKI T., WATANABE K., TANAKA R., OYAIZU H. Rapid identification of human intestinal bifidobacteria by 16S rRNA- targeted species- and group-specific primers. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1998, **167**, 113-21
- NEBRA Y., BLANCH R. A new selective Medium for *Bifidobacterium spp.* *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, **65**, 5173-5176.
- NEBRA Y., BONJOCH X., BLANCH A. Use of *Bifidobacterium dentium* as an indicator of the origin of fecal water pollution. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, **69**, 2651-2656.
- PACHER B., KNEIFEL W. Development of a culture medium for the detection and enumeration of bifidobacteria in fermented milk products. *Int. Dairy Journal.*, 1996, **6**, 43-64.
- PAYNE J., MORRIS A., BEERS P. Note: evaluation of selective media for the enumeration of *Bifidobacterium sp.* in milk. *J. Appl. Microbiol.*, 1999, **86**, 353-358.
- PETR J., RADA V. Bifidobacteria are obligate inhabitants of the crop of adult laying hens. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health.*, 2001, **48**, 227-233.
- RADA V., PETR J. A new selective medium for the isolation of glucose non-fermenting bifidobacteria from hen caeca. *J. Microbiol. Methods.*, 2000, **43**, 127-132.
- REQUENA T., BURTON J., MATSUKI T., MUNRO K., SIMON M.A., TANAKA R., WATANABE K., TANNOCK, G. Identification, detection and enumeration of human *Bifidobacterium* species by PCR targeting the transaldolase gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, **68**, 2420-2427.
- RHODES M., KATOR H. Sorbitol-fermenting bifidobacteria as indicators of diffuse human faecal pollution in estuarine watersheds. *J. Appl. Microbiol.*, 1999, **87**, 528-535.
- ROY D., WARD P., CHAMPAGNE G. Differentiation of bifidobacteria by use of pulsed-field gel electrophoresis and polymerase chain reaction. *Int. J. Food Microbiol.*, 1996, **29**, 11-29.
- ROY D., SIROIS S. Molecular differentiation of *Bifidobacterium* species with amplified ribosomal DNA restriction analysis and alignment of short regions of the *Idh* gene. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2000, **191**, 17-24.
- SIMPSON P., ROSS R., FITZGERALD G., STANTON C. *Bifidobacterium psychraerophilum sp. nov.* and *Aeriscardovia aeriphila gen. nov., sp. nov.*, isolated from a porcine caecum. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2004, **54**, 401-406.
- VENTURA M., ZINK R. 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.*, 2003, **69**, 7517-7522.

PUBLICATIONS ISSUES DU TRAVAIL DE THÈSE

- DELCENSERIE V., CHINA B., GAVINI F., BEERENS H., DAUBE G. Proposition pour un nouveau standard indicateur de la contamination d'origine fécale dans les aliments : le genre *Bifidobacterium*. *Ann. Méd. Vét.*, 2002, **146**, 279-293.
- DELCENSERIE V., BECHOUX N., LEONARD T., CHINA B., DAUBE G. Discrimination between *Bifidobacterium* species from human and animal origin by PCR-Restriction fragment length polymorphism. *J. Food Prot.*, 2004, **67**, 1284-1288.
- DELCENSERIE V. BECHOUX N., CHINA B., DAUBE G., GAVINI F. A PCR method for detection of bifidobacteria in raw milk and raw milk cheese: comparison with culture-based methods. *J. Microbiol. Methods*, 2005, **61**, 55-67.