

Identification et caractérisation de souches industrielles du genre *Bifidobacterium* par 2 méthodes de taxonomie moléculaire

C Herreman, D Asselin, G Novel

Laboratoire de génétique microbienne, IRBA, Université de Caen, 14032 Caen Cedex, France

(Reçu le 17 décembre 1993; accepté le 2 septembre 1994)

Résumé — L'absence d'un système d'identification simple et rapide des espèces du genre *Bifidobacterium* rend difficile l'utilisation de ces bactéries par l'industrie laitière. En vue d'obtenir de bons critères discriminants, nous avons identifié et caractérisé 3 souches de ferments industriels par 2 méthodes de taxonomie moléculaire en les comparant avec les souches type des espèces de *Bifidobacterium* utilisées commercialement. Par hybridation ADN-ADN, nous avons confirmé l'identification d'une des souches à l'espèce *B longum*, tandis que les 2 autres, supposées appartenir aux espèces *B infantis* et *B bifidum*, ont été identifiées à l'espèce *B animalis*. De plus, le polymorphisme de restriction des ADN digérés par l'endonucléase *Xba*I et observés après électrophorèse en champs pulsés permet de distinguer ces souches entre elles.

***Bifidobacterium* / taxonomie / polymorphisme des fragments de restriction / électrophorèse en champs pulsés / hybridation ADN-ADN**

Summary — Identification and characterization of *Bifidobacterium* industrial strains by methods of molecular taxonomy. The lack of a simple and rapid identification system for species of the *Bifidobacterium* genus is a difficulty in the use of these bacteria in industrial transformation. To obtain valuable discriminating criteria, we have identified and characterized three industrial starter strains by two methods of molecular taxonomy by comparing with type strains of presumed commercially used species of *Bifidobacterium*. By DNA-DNA hybridization we confirmed the identification of one strain to *Bifidobacterium longum* species and of two others, presumed to belong to *B infantis* and *B bifidum* species, to *Bifidobacterium animalis*. DNA restriction *Xba*I fragment polymorphism revealed by pulsed field gel electrophoresis permitted to distinguish these strains.

***Bifidobacterium* / taxonomy / DNA restriction fragment polymorphism / pulsed-field gel electrophoresis / DNA-DNA hybridization**

INTRODUCTION

Depuis moins de 10 ans, les bifidobactéries sont utilisées dans la fabrication et la commercialisation de laits fermentés pour l'alimentation de l'homme. Plusieurs espèces de ce genre, celles notamment d'origine humaine, sont considérées comme des probiotiques, c'est-à-dire comme des micro-organismes qui transitent vivants dans le tube digestif à des concentrations suffisantes pour exprimer chez l'hôte certaines activités métaboliques (Fuller, 1992). Bien que les bénéfices de ces produits sur la santé humaine soient encore mal connus, les laits fermentés dits au «Bifidus actif» bénéficient d'une image de marque exceptionnellement bonne, ce qui a favorisé un développement considérable de ces produits sur le marché des produits frais.

Afin de contrôler l'effet probiotique des bifidobactéries, il est aujourd'hui nécessaire pour l'industriel d'identifier avec précision les espèces utilisées. En effet, les 28 espèces du genre *Bifidobacterium* ne sont pas toutes des organismes commensaux. L'espèce *B dentium* est même considérée comme potentiellement pathogène (Gavini, 1989). Or, à ce jour l'identification et la taxonomie du genre *Bifidobacterium* par les méthodes «classiques» (profils fermentaire

et enzymatique) soulèvent encore un certain nombre de problèmes, en particulier au niveau de la reconnaissance des espèces (Bahaka *et al*, 1993).

Dans cette étude, nous avons identifié et caractérisé, par 2 méthodes de taxonomie moléculaire, 3 souches industrielles du genre *Bifidobacterium* et nous avons comparé les résultats à ceux obtenus avec les souches type des espèces présumées.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Souches et cultures

Les souches testées, BL, BI, BB, proviennent de ferments industriels dits de «souches pures» et appartiennent, selon le producteur, respectivement aux 3 espèces d'origine humaine : *B longum*, *B infantis* et *B bifidum*. L'origine des souches type utilisées dans cette étude est référencée dans le tableau I.

Hybridation ADN-ADN en milieu liquide

La méthode d'hybridation quantitative choisie est une adaptation de la méthode de Crosa *et al* (1973). Il s'agit de l'hybridation en milieu liquide utilisant la nucléase S₁ suivie de la précipitation à l'acide trichloroacétique.

Tableau I. Souches type de *Bifidobacterium* utilisées dans cette étude.
Type strains of Bifidobacterium used in this work.

<i>B longum</i>	ATCC 15707 ^T	NCTC 11818 ^T (Reuter E 194b)*
<i>B infantis</i>	ATCC 15697 ^T	DSM 20088 ^T (Reuter S12)*
<i>B bifidum</i>	ATCC 29521 ^T	
<i>B breve</i>	ATCC 15700 ^T	
<i>B animalis</i>	ATCC 25527 ^T	NCFB 2242 ^T (Mitsuoka R101-8)*

ATCC : American Type Culture Collection, Rockville, MD ; DSM : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Göttingen, Germany ; NCFB : National Collection of Food Bacteria, Shinfield, Reading, UK ; NCTC : National Collection of Type Cultures, Central Public Health Laboratory, London, United Kingdom. * Origine : Mme F Gavini, Institut national de la recherche agronomique, domaine du CERTIA, 59650 Villeneuve-d'Ascq Cedex, France

Électrophorèse en champs pulsés

Préparation de l'ADN chromosomique

À partir d'une préculture de la nuit, 5 ml de milieu frais sont ensemencés à 2% (v/v). Dès que la densité optique à 600 nm atteint 0,7–0,8, les cellules sont traitées avec 1 µg/ml d'ampicilline durant 1 h à 37°C et centrifugées à 5 000 g pendant 10 min. Le culot cellulaire est lavé 2 fois avec 2,5 ml de TEE (Tris-acétate 10⁻² mol/l, EDTA 0,1 mol/l, EGTA 10⁻² mol/l, pH 8), et homogénéisé dans 300 µl de TEE supplémenté en saccharose (6,7% p/v). La suspension cellulaire est alors ajoutée volume à volume à une solution d'agarose *low melting* (Nu Sieve GTG, FMC) à 3% dans du TAE (Tris 0,04 mol/l, acétate de sodium 0,04 mol/l, EDTA 2.10⁻³ mol/l) maintenue en surfusion à 42°C.

Lyse cellulaire

Les blocs d'agarose sont placés dans 5 ml de TEE et traités avec 25 mg de lysozyme et 50 µl de Sarkosyl 5% pendant 16 h à 37°C sous agitation. Après 16 h d'incubation à 37°C dans 5 ml de TEE frais contenant 5 mg de protéinase K et 500 µg de SDS 10%, ces blocs sont dialysés dans 50 µl de TE (Tris-acétate 10⁻² mol/l, EDTA 10⁻³ mol/l) avec 200 µl de PMSF (phényl méthane sulfanyl fluorure, 10⁻³ mol/l) pendant 1 h à 4°C sous agitation douce, puis dans du TE à 4°C pendant 1 h, 2 fois de suite.

Digestion enzymatique

Les ADN sont ensuite hydrolysés par l'endonucléase de restriction *Xba*I, déjà utilisée par Pietersen (1991) et Bourget *et al* (1992) pour l'étude du génome des bifidobactéries. Chaque bloc est lavé pendant 15 min dans 1 ml de tampon de digestion (Tris-HCl 5.10⁻² mol/l, MgCl₂ 10⁻² mol/l, NaCl 0,1 mol/l, dithioérythritol 10⁻³ mol/l, pH 7,5), puis incubé 16 h dans 200 µl de ce tampon additionné de 2 µl d'enzyme (24 unités) à 37°C. La réaction est arrêtée avec 1 ml de TEE.

Électrophorèse en champs pulsés

L'électrophorèse en champs pulsés (Tanskanen *et al*, 1990) est mise en œuvre à partir du système CHEF DR II (Biorad). Le gradient d'impul-

sion utilisé est de 1 à 20 s pendant 20 h à 14°C et 180 V.

Analyse d'images

Les négatifs photographiques des gels sont traités à l'aide de l'application Whole Band du logiciel Bio-image (Millipore) sur un ordinateur compatible PC.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Hybridation ADN-ADN en milieu liquide

Afin d'identifier avec certitude «l'espèce génomique» à laquelle appartiennent les 3 souches industrielles, nous avons utilisé la méthode d'hybridation quantitative ADN-ADN en milieu liquide (tableau II). Lorsque le pourcentage d'homologie obtenu entre la souche testée et la souche type était inférieur à 60%, nous avons poursuivi l'identification avec d'autres souches type. Pour un pourcentage d'homologie compris entre 60% et 100%, nous avons déterminé la différence de température de demi-dénaturation (ΔT_m) entre ces hybrides (selon la méthode de Grimont, 1988).

Selon le comité *ad hoc* de conciliation des approches systématiques bactériennes de 1987 (Wayne *et al*, 1987) l'appartenance d'une souche à une espèce donnée est déterminée par un pourcentage d'homologie d'ADN supérieur à 70% entre la souche testée et la souche type correspondante et une valeur ΔT_m au plus égale à 5°C.

Les espèces *B longum* et *B infantis*

Le pourcentage d'homologie élevé (127%) obtenu après hybridation entre la souche BL et la sonde *B longum* NCTC 11818^T mais aussi une ΔT_m entre ces 2 souches inférieure à 1,5°C, nous permettent d'identifier BL à l'espèce *B longum*. Toutefois, la

Tableau II. Hybridation ADN-ADN en milieu liquide * (% homologie).
DNA-DNA hybridization in liquid medium (homology percentage).

Souches testées	Souches	Sonde				
		B longum NCTC 11818 ^T	B infantis DSM 20088 ^T	B bifidum ATCC 29521 ^T	B breve ATCC15700 ^T	B animalis NCFB 2242 ^T
<i>B longum</i>	NCT 11818 ^T ATCC 15707 ^T	100 132	69	9	38	13
<i>B infantis</i>	DSM 20088 ^T ATCC 15697 ^T	61 69	100 120	7	40	6
<i>B bifidum</i>	ATCC 29521 ^T	22	19	100	27	13
<i>B breve</i>	ATCC 15700 ^T				100	13
<i>B animalis</i>	NCFB 2242 ^T ATCC 25527 ^T	5	0	3	3	100 127
BL		127	87	13	40	14
BI		9	8	5	8	115
BB		10	8	7	6	108

* Chaque valeur du coefficient d'hybridation (% d'homologie) est la moyenne de 2 mesures indépendantes.
Each value of the hybridization is the average of 2 independent measurements.

souche BL hybride aussi fortement (87%) avec la souche *B infantis* DSM 20088^T (tableau II). Cette étroite relation ADN-ADN est d'autre part confirmée par un pourcentage d'hybridation de 61% à 69% entre la souche type *B longum* NCTC 11818^T et la souche type *B infantis* DSM 20088^T. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés dans la littérature (Bahaka *et al*, 1993).

L'espèce *B animalis*

Les pourcentages de réassociation obtenus entre la souche *B animalis* NCFB 2242^T, BI et BB sont tous supérieurs à 100%, ce qui nous permet de conclure que BI et BB appartiennent bien à l'espèce *B ani-*

malis. Cette étroite parenté des 3 souches est confirmée par des valeurs de ΔT_m inférieures à 2,2°C.

Polymorphisme de restriction de l'ADN par électrophorèse en champs pulsés

Selon Grimont et Grimont (1991) et Forbes *et al* (1991), l'ADN chromosomique digéré par une endonucléase de restriction et visualisé après électrophorèse en champs pulsés fournit une empreinte caractéristique utilisable pour la classification d'isolats. Cette technique permet d'établir le profil de restriction de l'ADN constitutif, et aussi de mesurer la taille du génome. Le nombre et

la taille des fragments du génome des souches étudiées après hydrolyse par *Xba*I sont rassemblés dans le tableau III.

Les profils de restriction de *B infantis* ATCC15697^T et *B infantis* DSM 20088^T sont similaires et se caractérisent par la présence de 18 fragments de taille variant de 13 kb à 204 kb. Ils se distinguent des autres profils par un nombre plus important de fragments, notamment de faible taille.

La séparation des fragments d'ADN digéré par *Xba*I de la souche BL est diffuse, ce qui rend difficile la comparaison de leur profil. Cependant, la présence d'une bande de taille élevée (280 kb) permet de différencier la souche BL des autres souches. De plus BL

se distingue des autres souches par une taille supérieure (2,1 Mb). Toutefois, cette valeur ne semble pas seulement caractéristique de l'espèce *B longum* puisque la taille du génome de *B breve* a été également estimée à 2,1 Mb par Bourget *et al* (1992).

B animalis NCFB 2242^T se distingue des autres profils par un faible nombre de fragments (10) et surtout par l'absence de fragments de taille comprise entre 55 et 97 kb.

Les profils des souches BI et BB, identifiées à l'espèce *B animalis*, sont très proches l'un de l'autre par la taille de leur génome (respectivement voisine de 1,1 et 1,5 Mb) et le nombre de fragments. Ils se distinguent toutefois par la présence de fragments de

Table III. Analyse de restriction *Xba*I et taille du génome des souches de *Bifidobacterium* après électrophorèse en champs pulsés.

*Xba*I restriction analysis and genome size of *Bifidobacterium* strains after pulsed field gel electrophoresis.

	B infantis		BL	BI	BB	B animalis NCFB 2242 ^T
	DMS 20088 ^T	ATCC 15697 ^T				
Nombre de fragments	18	17	18	13	13	10
Taille du génome (en Mb)	1,3	1,4	2,1	1,1	1,5	1,1
Tailles des fragments digérés par <i>Xba</i> I (en kb)	204	203	282	223	278	251
	188	187	238	177	223	202
	142	142	215	162	209	167
	116	139	183	131	180	133
	100	117	174	89	167	102
	92	100	136	71	136	97
	83	91	127	58	91	55
	68	83	113	50	71	45
	59	67	108	39	59	38
	49	58	96	28	50	26
	41	48	88	23	40	
	37	41	73	19	31	
	31	37	67	15	23	
	23	31	54			
	21	21	46			
	18	18	43			
	15	16	39			
	13		36			
			10			

taille de 278 kb et 209 kb chez la souche BB. Ces souches se différencient ainsi de la souche type par la présence de fragments de taille comprise entre 55 et 97 kb. Ces profils permettent donc de distinguer les souches au sein de l'espèce *B animalis*.

CONCLUSION

L'identification des espèces du genre *Bifidobacterium* employées dans les produits laitiers présente un intérêt essentiel pour évaluer les effets que ces micro-organismes pourraient avoir sur la santé de l'hôte. Or à ce jour, peu de méthodes de caractérisation, permettant de vérifier correctement les souches utilisées, sont facilement applicables dans un laboratoire industriel.

En vue d'obtenir un moyen de caractérisation plus discriminant, 3 souches pures de bifidobactéries provenant de ferments ont été identifiées et caractérisées par deux méthodes de taxonomie génomique.

L'hybridation ADN-ADN a été utilisée comme méthode de référence pour identifier l'espèce de ces bactéries. Elle a permis de confirmer une forte similitude génomique de la souche BL avec la souche type de l'espèce *B longum*, tandis que les souches BI et BB commercialisées comme appartenant respectivement aux espèces *B infantis* et *B bifidum* ont été identifiées à l'espèce *B animalis*.

Si l'hybridation ADN-ADN permet de séparer les espèces, la comparaison des profils de restriction permet de différencier chacune des souches testées. De plus, cette technique a permis d'évaluer de manière préliminaire la taille globale de l'ADN chromosomique qui varie de 1,1 à 2,1 Mb selon les souches. La différence observée demanderait cependant à être vérifiée avec une autre enzyme de restriction. Cette méthode devrait permettre dans le domaine industriel de reconnaître et de suivre (sous forme d'empreintes génomiques) la présence de telle ou telle souche dans des populations mixtes.

REMERCIEMENTS

Cette étude fait partie du travail réalisé pour l'obtention d'un diplôme d'ingénieur CNAM en biologie industrielle et agro-alimentaire.

Nous remercions F Gavini pour l'envoi de certaines souches-type.

RÉFÉRENCES

- Bahaka D, Neut C, Khattabi A, Monget D, Gavini F (1983) Phenotypic and genomic analyses of human strains belonging or related to *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, and *Bifidobacterium breve*. *Int J Syst Bacteriol* 43, 565-573
- Bourget B, Simonet JM, Decaris B (1992) Estimation de la taille du génome, du nombre de loci ribosomiques et du contenu plasmidique chez *Bifidobacterium breve*. *V^e réunion du Club des bactéries lactiques*, CBL 92, Nancy, 2-9 septembre
- Crosa JH, Brenner DJ, Falkow S (1973) Use of a single-strand specific nuclease for analysis of bacterial and plasmid deoxyribonucleic acid homo- and heteroduplexes. *J Bacteriol* 115, 904-911
- Forbes KJ, Bruce KD, Jordens ZJ, Ball A, Pennington TH (1991) Rapid methods in bacterial DNA fingerprinting. *J Gen Microbiol* 137, 2051-2058
- Fuller R (1992) History and development of probiotics. *In: Probiotics. The scientific basis* (Fuller R, ed). Chapman & Hall, London
- Gavini F (1989) *Bifidobacterium*: Classification; aspect critique. *In: Bifidobacterium et facteurs bifidogènes* (Association pour la recherche sur les bifidobactéries et les bactéries anaérobies, éd). ID2 Communication, Paris, 47-53
- Grimont PAD (1988) Use of DNA reassociation in bacterial classification. *Can J Microbiol* 34, 541-546
- Grimont F, Grimont PAD (1991) DNA Fingerprinting. *In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics* (Stackebrandt E, Goodfellow M, eds). John Wiley & sons, Chichester
- Peitersen N (1991) Probiotic starter cultures of food products. *In: Les bactéries lactiques: actes du colloque LACTIC 1991* (Novel G, Le Querler JF, eds). Centre de publications de l'université de Caen
- Tanskanen EI, Tulloch DL, Hillier AJ, Davidson BE (1990) Pulsed-field gel electrophoresis of *Sma*I digests of lactococcal genomic DNA, a novel method of strain identification. *Appl Environ Microbiol* 56, 3105-3111
- Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR *et al* (1987) Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol* 37, 463-464