

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
—
**INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE**
—
COURBEVOIE
—

①① N° de publication : **3 020 949**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)
②① N° d'enregistrement national : **14 54422**
⑤① Int Cl⁸ : **A 61 K 35/74** (2017.01), A 61 K 39/07, C 12 Q 1/02,
A 61 P 3/00

①②

BREVET D'INVENTION

B1

⑤④ COMPOSITION PERMETTANT DE FAVORISER LA CROISSANCE JUVENILE HUMAINE ET ANIMALE EN CAS DE MALNUTRITION.

②② Date de dépôt : 16.05.14.

③③ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la demande : 20.11.15 Bulletin 15/47.

④⑤ Date de la mise à disposition du public du brevet d'invention : 09.02.18 Bulletin 18/06.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de recherche :

Se reporter à la fin du présent fascicule

⑥① Références à d'autres documents nationaux apparentés :

Demande(s) d'extension :

⑦① Demandeur(s) : *ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE LYON Etablissement public , UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1 et CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S) Etablissement public — FR.*

⑦② Inventeur(s) : LEULIER FRANCOIS, STORELLI GILLES et SCHWARZER MARTIN.

⑦③ Titulaire(s) : *ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE LYON Etablissement public, UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1, CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S) Etablissement public.*

⑦④ Mandataire(s) : CABINET BECKER ET ASSOCIES.

FR 3 020 949 - B1



Composition permettant de favoriser la croissance juvénile humaine et animale en cas de malnutrition

La présente invention concerne une composition pharmaceutique ou probiotique permettant de favoriser la croissance juvénile humaine et animale en cas de malnutrition. Cette composition comprend comme principe actif ou ingrédient au moins une bactérie à tropisme intestinal, de préférence une bactérie lactique.

Décrit comme « un organe additionnel », la communauté microbienne intestinale (ou microbiote intestinal) joue un rôle clé bénéfique pour l'hôte en exerçant de nombreuses fonctions biologiques, telles que l'aide à l'efficacité de la digestion, le métabolisme des substrats, la lutte contre les pathogènes, ou encore la mise en place et l'homéostasie des réponses immunitaires. Les déséquilibres entre différentes populations bactériennes intestinales ont des répercussions parfois délétères, conduisant au développement de diverses pathologies comme des maladies inflammatoires chroniques ou des désordres métaboliques dont l'obésité ou encore le diabète de type 2. Ces déséquilibres sont également potentiellement impliqués dans le développement de cancers et la mise en place de syndromes comportementaux. Le maintien de l'équilibre du microbiote intestinal est donc essentiel : influencer sa composition et/ou son activité serait un atout majeur pour le traitement des syndromes précités. Dans cet esprit, l'idée de l'utilisation de souches bactériennes dites « probiotiques » pour intervenir sur des pathologies influencées par le microbiote trouve tout son sens.

Définis en 2001 par l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) et l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), les probiotiques sont des « micro-organismes vivants, qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exercent des effets positifs sur la santé, au-delà des effets nutritionnels traditionnels ».

La présente invention s'inscrit quant à elle dans le rétablissement de conditions permettant d'optimiser la croissance juvénile ou de restaurer une croissance juvénile normale dans un contexte de malnutrition.

La présente invention a ainsi pour objectif de proposer de nouvelles compositions permettant de favoriser la croissance juvénile ou de rétablir une croissance juvénile normale chez des sujets, humains ou animaux, ayant été ou étant soumis à une malnutrition, notamment une sous-alimentation et/ou une mauvaise assimilation.

Un autre objectif de l'invention est de fournir de telles compositions, basées

sur l'emploi de souches bactériennes ayant un tropisme intestinal, notamment de souches commensales, ou acceptables en tant que probiotique.

Un autre objectif de l'invention est de fournir de telles compositions pouvant aussi s'inscrire dans un contexte thérapeutique.

5 Un autre objectif encore de l'invention est d'offrir une méthode de traitement probiotique ou thérapeutique.

Un autre objectif encore de l'invention est de fournir de telles compositions et méthodes permettant de supporter une allégation santé et/ou nutritionnelle en accord avec la législation en vigueur, notamment la législation européenne.

10 L'invention est basée sur le fait que certaines souches de bactéries ayant un tropisme intestinal chez une espèce animale ont un effet favorisant ou rétablissant la croissance juvénile chez un sujet de cette même espèce ou d'une autre espèce qui est soumis à une malnutrition, notamment une sous-alimentation ou une mauvaise assimilation. Il a pu ainsi être démontré que des souches bactériennes du genre
15 *Lactobacillus* étaient capables de favoriser la croissance juvénile aussi bien dans un modèle drosophile que dans un modèle souris couplés à des régimes nutritionnels carencés, et en outre un lien a pu être établi entre ces résultats chez la souris et une augmentation du titre sérique d'IGF-1 chez les souris traitées dans ces conditions avec ces bactéries.

20 La présente invention a donc pour objet une composition comprenant au moins une souche de bactérie ayant un tropisme intestinal, en particulier une bactérie lactique, pour utilisation pour favoriser la croissance juvénile en cas de malnutrition. La notion de malnutrition regroupe la sous-alimentation, la suralimentation et la mauvaise assimilation. L'invention vise en particulier la sous-alimentation et/ou la
25 mauvaise assimilation. Elle vise de préférence la sous-alimentation. L'indication de la composition pourra être thérapeutique ou santé, comme médicament, ou nutritionnelle, comme probiotique.

Par bactérie ayant un « tropisme intestinal », on entend une bactérie à la capacité de passer la barrière gastrique et qui est capable de persister dans l'intestin.

30 Conformément à une caractéristique avantageuse de l'invention, la bactérie peut favoriser la production d'IGF-1 chez l'homme ou l'animal qui est traité par la composition conforme à l'invention.

L'invention propose notamment des souches de bactérie appartenant aux familles suivantes : Lactobacillaceae, Streptococcaceae, Enterococcaceae,
35 Leuconostocaceae, Bifidobacteriaceae. Suivant une modalité, l'invention utilise une ou des souches du genre *Lactobacillus*, en particulier de l'une des espèces

suivantes, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*.

Plus particulièrement, il s'agit de bactéries appartenant aux espèces *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*.

Suivant un mode de réalisation, la souche de bactérie est choisie parmi *L. plantarum* WJL, *L. casei* ATCC 393, *L. casei* L919, *L. paracasei* ATCC25302, *L. paracasei* Shirota, *L. fermentum* ATCC9338, *L. rhamnosus* L900, *L. rhamnosus* L908, *L. rhamnosus* GG.

Dans un mode de réalisation spécifique, il s'agit de bactéries de l'espèce *Lactobacillus plantarum*, par exemple la souche WJL.

Suivant une modalité, les compositions selon l'invention comprennent au moins une souche de bactérie choisie dans ces groupes, qui présente les propriétés requises et permet de favoriser ou rétablir une croissance juvénile en dépit de l'épisode de malnutrition. Bien entendu, la composition selon l'invention peut comprendre plus d'une souche de bactérie répondant aux besoins de l'invention. Notamment, la composition comprend 2 ou plus de ces souches de bactéries, choisies dans une même espèce ou dans des espèces différentes.

Suivant un mode de réalisation intéressant, la bactérie est un *L. plantarum*. Une souche appropriée est *L. plantarum* WJL (Eun-Kyoung Kim et al., Genome Announcements, November/December 2013, vol. 1, n° 6 e00937-13, GenBank AUTE00000000, *Lactobacillus plantarum* WJL, whole genome shotgun sequencing project). Cette souche WJL a été initialement isolée et peut être isolée de la drosophile (JH Ryu et al., Science 2008, 319 : 777-782).

D'autres exemples de souches appropriées sont les suivantes : *L. casei* ATCC 393, *L. casei* L919 (Koryszewska-Baginska A. et al., 26 septembre 2013, Genome Announc), *L. paracasei* ATCC25302, *L. paracasei* Shirota (Yuki N et al., Int J Food Microbiol. 1^{er} avril 1999;48(1) :51-7), *L. fermentum* ATCC9338, *L. rhamnosus* L900 (Aleksandrak-Piekarczyk T. et al., Genome Announc, 15 août 2013), *L. rhamnosus* L908 (Koryszewska-Baginska A. et al., 20 février 2014, Genome Announc), *L. rhamnosus* GG (Kankainen M. et al., Proc Natl Acad Sci USA, 6 octobre 2009).

La présente invention apporte donc à la technique l'enseignement que des souches bactériennes à tropisme intestinal favorisent la croissance juvénile notamment chez des patients (humains ou animaux) malnutris. Mais l'invention ne se limite pas à cet enseignement, elle donne en outre à l'homme du métier de déterminer de manière sûre les souches de bactéries utiles pour l'invention.

Différents critères peuvent être à la base de tests, en étant utilisés seuls ou en association. Parmi ces critères, on notera le taux sérique d'IGF-1 chez l'animal modèle (e.g. souris), la croissance larvaire chez *Drosophila melanogaster*, la croissance de souris modèles illustrée, par exemple, par la taille des fémurs ou la prise de taille des animaux. Sur la base de ces critères ou de critères similaires, il est possible pour l'homme du métier de mettre au point des tests comparant des individus élevés en présence ou en l'absence de la bactérie à tester, dans des conditions de malnutrition. L'invention apporte un plus en proposant des modèles animaux axéniques et l'élevage des animaux en présence ou en l'absence de la bactérie ou des bactéries à tester permettant de concentrer le test sur l'analyse des propriétés intrinsèques de la ou les souches testées et ainsi de s'affranchir de l'effet que le microbiote intestinal résidant d'animaux conventionnels pourrait avoir dans le contexte du test fonctionnel. Il en résulte une prédictivité accrue du test quant au potentiel fonctionnel de la souche testée.

On entend par organisme « axénique » un organisme (e.g. drosophile, souris) élevé dans un environnement dépourvu de microorganismes et donc dépourvu de flore intestinale.

On entend par organisme « monoxénique » un organisme (e.g. drosophile, souris) axénique associé élevé en présence d'un unique microorganisme et donc porteur de cet unique microorganisme en guise de flore intestinale.

Suivant une caractéristique de l'invention, les souches de bactérie selon l'invention se caractérisent par le fait qu'elles répondent positivement à, ou ont été sélectionnées en utilisant, un test dans lequel on compare la croissance de larves issues de drosophiles axéniques sur un milieu nutritif carencé en levure (et donc en protéines) par rapport à un milieu nutritif conventionnel. Les milieux nutritionnels conventionnels de laboratoire comprennent généralement *a minima* une farine végétale, typiquement de maïs, de la levure inactivée, typiquement de la levure de bière ou de la levure de boulanger (*Saccharomyces cerevisiae*), de l'agar et de l'eau. Un milieu carencé en levure inactivée ne permet pas un développement post-embryonnaire (c.a.d. juvénile) optimum des larves de drosophiles, comme il a été rapporté dans G. Storelli et al., Cell Metabolism 14, 403-414, 2011. Un groupe d'embryons est en outreensemencé avec la bactérie à tester, ce qui permet aux larves émergeant des embryons d'être associées à la bactérie à tester. On peut donc détecter si cette bactérie est susceptible de favoriser ou permettre la croissance juvénile malgré un milieu nutritif carencé en levure.

Le test drosophile est typiquement mené de la manière suivante :

- on dispose d'un lot d'embryons issus de parents *Drosophila melanogaster* (e.g.

souche *Drosophila yw*, ou toute autre souche dites "sauvage") axéniques ;

- à J1 : on répartit ces embryons en au moins 2 groupes (40 embryons, réalisé en triplicat pour un total de 120 embryons par groupe) sur un milieu nutritionnel comprenant de la farine de maïs de l'agar et de l'eau, carencé en levure, l'un des groupes d'embryons est en outre inoculé par une suspension d'environ 10^8 CFU de la bactérie à tester dans un tampon salin (e.g. PBS), ce qui forme le groupe monoxénique, l'autre groupe formant le groupe axénique, on conduit l'élevage à environ 25°C jusqu'à J7 ; typiquement le milieu de culture est constitué, pour 1 litre de milieu, de 7,14 g d'agar, 80 g de farine de maïs et 6 g de levure inactivée, le milieu est cuit dans l'eau bouillante pendant 10 min, puis refroidissement ; typiquement, le même milieu, non carencé en levure inactivée, contient 50 g de levure inactivée;
- à J7 : on récupère au minimum 60 larves de drosophiles de chaque groupe issues des embryons inoculés ou non (respectivement larves monoxéniques et larves axéniques), on leur applique un choc thermique rapide (e.g. 5 secondes ; typiquement les larves sont placées 5 secondes sur une plaque chauffée à 100°C; il s'agit de tuer les larves sans les déformer pour permettre la mesure de leur taille) ;
- on détermine la moyenne de la longueur des larves de chacun des groupes, et on compare les moyennes obtenues ;
- la souche de bactérie testée est considérée comme répondant positivement au test si la moyenne de la longueur des larves du groupe monoxénique est supérieure à la moyenne de la longueur des larves du groupe axénique avec une valeur de p inférieure ou égale à 0,001, de préférence inférieure ou égale à 0,0001 dans le test statistique de Mann-Whitney, réalisé sur l'ensemble du jeu de données des tailles des larves des deux groupes.

La présente invention a donc pour objet une composition comprenant au moins une souche de bactérie ayant un tropisme intestinal, en particulier une bactérie lactique, pour utilisation pour favoriser la croissance juvénile en cas de malnutrition, dans laquelle la souche de bactérie répond positivement au test sur drosophile tel que décrit ci-dessus. A titre d'exemples, on peut citer les souches suivantes : *L. plantarum* WJL, *L. casei* ATCC 393, *L. casei* L919, *L. paracasei* ATCC25302, *L. paracasei* Shirota, *L. fermentum* ATCC9338, *L. rhamnosus* L900, *L. rhamnosus* L908, *L. rhamnosus* GG. D'autres souches peuvent être identifiées parmi les bactéries à tropisme intestinal et notamment parmi les espèces mentionnées plus haut.

Dans un mode de réalisation de l'invention, la souche WJL est utilisée comme

souche de référence afin d'identifier et sélectionner des souches bactériennes ayant un effet « marqué » sur la croissance juvénile, à savoir un effet proche de celui de cette souche WJL (effet non significativement différent de la souche WJL), ou un effet « fort » sur la croissance juvénile (effet significativement supérieur à la souche WJL).

5 Pour ce faire, le test drosophile (incluant 60 larves par condition) est appliqué à la souche WJL et à la souche à tester (en parallèle, de préférence, ou alors on peut disposer de données de référence préalablement générées pour la souche WJL, par exemple les données présentées dans les exemples). On compare ensuite les moyennes obtenues pour les deux souches. La souche de bactérie testée est
10 considérée comme étant une souche à effet marqué si la moyenne de la longueur des larves du groupe monoxénique n'est pas significativement différente de la moyenne de la longueur des larves du groupe WJL avec une valeur de p supérieure à 0,001 dans le test statistique de Mann-Whitney, réalisé sur l'ensemble du jeu de données. L'effet est fort si ladite moyenne pour la souche à tester est
15 significativement supérieure à la moyenne pour la souche WJL, ce qui est le cas lorsque la valeur de p du test statistique est inférieure ou égale à 0,0001. L'effet est qualifié d'intermédiaire si ladite moyenne pour la souche à tester est significativement inférieure à la moyenne pour la souche WJL, ce qui est le cas lorsque la valeur de p du test statistique est inférieure ou égale à 0,0001.

20 La présente invention a donc pour objet une composition comprenant au moins une souche de bactérie ayant un tropisme intestinal, en particulier une bactérie lactique, pour utilisation pour favoriser la croissance juvénile en cas de malnutrition, dans laquelle la souche de bactérie a un effet marqué ou fort sur la croissance dans le modèle drosophile tel que décrit ci-dessus. A titre d'exemples, on peut citer les
25 souches suivantes : *L. plantarum* WJL, *L. casei* ATCC 393, *L. casei* L919, *L. paracasei* ATCC25302, *L. paracasei* Shirota, *L. fermentum* ATCC9338, *L. rhamnosus* L900, *L. rhamnosus* L908, *L. rhamnosus* GG. D'autres souches peuvent être identifiées parmi les bactéries à tropisme intestinal et notamment parmi les espèces mentionnées plus haut.

30 Selon l'invention, il est aussi possible de déterminer si une souche de bactérie à tropisme intestinal permet de favoriser la croissance en cas de malnutrition, en utilisant un modèle souris axénique qui permet de réaliser un suivi de croissance squelettique des souris en présence de la bactérie à tester en comparaison avec l'absence de microbiote et/ou avec la présence d'une souche de bactérie de
35 référence. Ce modèle peut être utilisé en première intention ou sur des souches ayant répondu positivement au test drosophile.

 Suivant une caractéristique de l'invention, les souches de bactérie selon

l'invention se caractérisent par le fait qu'elle répond positivement au test de croissance squelettique suivant :

- à partir d'une même lignée de souris (typiquement souris Balb/c) on établit une lignée de souris parentales axéniques et une lignée de souris parentales monoxéniques (associées à la bactérie à tester), et l'on produit des juvéniles qui sont élevées avec les parents en milieu nutritionnel conventionnel jusqu'à leur sevrage (à J21) ; pour former le groupe des juvéniles monoxéniques, on utilise des parents mono-associés avec la souche de bactérie à tester,

- à J21 : on dispose de 8 juvéniles sevrées issues de chacune de ces deux lignées, formant le groupe monoxénique et le groupe axénique, et on les élève en régime nutritionnel carencé en protéines (8%) et en lipides (2,5%); typiquement, le régime nutritionnel conventionnel comprend 23% de protéines et 5% de lipides,

- à J 56 : on détermine la moyenne des tailles des souris pour un groupe considéré par la mesure de l'extrémité du museau à la base de la queue de chaque individu ; une autre mesure possible consiste à sacrifier les individus, à en prélever les fémurs et à mesurer ces derniers,

- la souche de bactérie lactique étant considérée comme répondant positivement au test si la taille moyenne des individus et/ou des fémurs, du groupe monoxénique, est supérieur à la taille moyenne, respectivement, des individus et/ou des fémurs, du groupe axénique, avec une valeur de p inférieure ou égale à 0,05, dans le test statistique de Tukey.

La présente invention a donc pour objet une composition comprenant au moins une souche de bactérie ayant un tropisme intestinal, en particulier une bactérie lactique, pour utilisation pour favoriser la croissance juvénile en cas de malnutrition, dans laquelle la souche de bactérie répond positivement au test de croissance squelettique sur souris. Le test drosophile permet un criblage plus rapide, de sorte que généralement, l'on dispose aussi du test sur drosophile, et la souche de bactérie répond positivement aux tests drosophile et de croissance squelettique. A titre d'exemple, on peut citer la souche suivante : *L. plantarum* WJL. D'autres souches peuvent être identifiées parmi les bactéries à tropisme intestinal et notamment parmi les espèces et souches mentionnées plus haut, notamment parmi les souches *L. casei* ATCC 393, *L. casei* L919, *L. paracasei* ATCC25302, *L. paracasei* Shirota, *L. fermentum* ATCC9338, *L. rhamnosus* L900, *L. rhamnosus* L908, *L. rhamnosus* GG.

Dans un mode de réalisation de l'invention, la souche WJL est utilisée comme souche de référence afin d'identifier et de sélectionner des souches bactériennes ayant un effet « marqué » sur la croissance juvénile, à savoir un effet proche de celui de cette souche WJL (effet non significativement différent de la souche WJL), ou un

effet « fort » sur la croissance juvénile (effet significativement supérieur à la souche WJL).

Pour ce faire, le test souris (incluant 8 souris par condition) est appliqué à la souche WJL et à la souche à tester (en parallèle, de préférence, ou alors on peut disposer de données de référence préalablement générées pour la souche WJL, par exemple les données présentées dans les exemples). On compare ensuite les moyennes obtenues pour les deux souches. La souche de bactérie testée est considérée comme étant une souche à effet marqué si la moyenne de la taille moyenne des individus et/ou des fémurs du groupe monoxénique n'est pas significativement différente de la moyenne correspondante pour le groupe WJL avec une valeur de p supérieure à 0,05 dans le test statistique de Tukey. L'effet est fort si ladite moyenne pour la souche à tester est significativement supérieure à la moyenne pour la souche WJL, ce qui est le cas lorsque la valeur de p du test statistique est inférieure ou égale à 0,05. L'effet est qualifié d'intermédiaire si ladite moyenne pour la souche à tester (qui a été qualifiée par rapport aux souris axéniques dans le test précédent) est significativement inférieure à la moyenne pour la souche WJL, ce qui est le cas lorsque la valeur de p du test statistique est inférieure ou égale à 0,05.

La composition selon l'invention comprendra de préférence une souche de bactérie ayant un tel effet marqué ou fort.

Les souches de bactérie selon l'invention peuvent se caractériser par le fait qu'elles ont un impact positif sur le taux d'IGF-1 sérique. C'est ainsi qu'il a été possible, sur la base d'un modèle de souris axéniques, de montrer que des souris élevées en milieu à faible teneur en protéines mais en présence de la bactérie (souris monoxéniques) avaient une croissance supérieure et en même temps un taux d'IGF-1 sérique supérieur, par rapport à ces mêmes souris élevées avec ce milieu carencé en protéines et en l'absence de la bactérie (souris axéniques). Ceci permet de proposer un test permettant de déterminer si une souche de bactérie a le potentiel à augmenter le taux sérique d'IGF-1, ce test pouvant être appliqué en association avec un test de croissance squelettique afin de préciser ou d'affiner l'effet de la souche dans ce contexte de croissance juvénile, ou en première intention.

Dans ce cas, les souches de bactérie selon l'invention se caractérisent par le fait qu'elles répondent positivement au test du taux d'IGF-1 sérique suivant :

- à partir d'une même lignée de souris (typiquement souris Balb/c) on établit une lignée de souris parentales axéniques et une lignée de souris parentales monoxéniques (associées à la bactérie à tester), et l'on produit des juvéniles qui sont élevées avec les parents en milieu nutritionnel conventionnel jusqu'à leur sevrage (à J21) ; pour former le groupe des juvéniles monoxéniques, on utilise des parents

mono-associés avec la souche de bactérie à tester,

- à J21 : on dispose de 8 juvéniles sevrées issues de chacune de ces deux lignées, formant le groupe monoxénique et le groupe axénique, et on les élève en régime nutritionnel carencé en protéines (8%) et en lipides (2,5%); typiquement, le régime nutritionnel conventionnel comprend 23% de protéines et 5% de lipides,

- à J 56 : on prélève du sang des juvéniles de chaque groupe et on détermine le taux sérique moyen d'IGF-1 pour chaque groupe; cette mesure du taux sérique d'IGF-1 est de préférence réalisée sur du sérum dilué (1:25) ; on utilise de préférence des kits ELISA commerciaux de détection de l'IGF-1 en suivant les instructions du fabricant,

- la souche de bactérie lactique est considérée comme répondant positivement au test si le taux sérique moyen d'IGF-1 du groupe monoxénique est supérieur au taux sérique moyen du groupe axénique avec une valeur de p inférieure ou égale à 0,05 dans le test statistique de Tukey.

La présente invention a donc pour objet une composition comprenant au moins une souche de bactérie ayant un tropisme intestinal, en particulier une bactérie lactique, pour utilisation pour favoriser la croissance juvénile en cas de malnutrition, dans laquelle la souche de bactérie augmente le taux d'IGF-1 sérique. Il s'agit notamment d'une souche de bactérie qui répond positivement au test sur souris tel que décrit ci-dessus.

La présente invention a aussi pour objet une composition comprenant au moins une souche de bactérie ayant un tropisme intestinal, en particulier une bactérie lactique, pour utilisation pour favoriser la croissance juvénile en cas de malnutrition, dans laquelle la souche de bactérie répond positivement au test de croissance squelettique sur souris et augmente le taux sérique d'IGF-1 chez ces mêmes souris, notamment ladite souche répond positivement également au test sur drosophile.

A titre d'exemple, on peut citer la souche suivante : *L. plantarum* WJL. D'autres souches peuvent être identifiées parmi les bactéries à tropisme intestinal et notamment parmi les espèces et souches mentionnées plus haut, notamment parmi les souches *L. casei* ATCC 393, *L. casei* L919, *L. paracasei* ATCC25302, *L. paracasei* Shirota, *L. fermentum* ATCC9338, *L. rhamnosus* L900, *L. rhamnosus* L908, *L. rhamnosus* GG.

Dans un mode de réalisation de l'invention, la souche WJL est utilisée comme souche de référence afin d'identifier et sélectionner des souches bactériennes ayant un effet « marqué » sur le taux sérique d'IGF-1, à savoir un effet proche de celui de cette souche WJL (effet non significativement différent de la souche WJL), ou un effet « fort » sur le taux sérique d'IGF-1 (effet significativement supérieur à la souche

WJL).

Pour ce faire, le test souris (incluant 8 souris par condition) de mesure du taux sérique d'IGF-1 est appliqué à la souche WJL et à la souche à tester (en parallèle, de préférence, ou alors on peut disposer de données de référence préalablement
5 générées pour la souche WJL, par exemple les données présentées dans les exemples). On compare ensuite les moyennes de taux sérique d'IGF-1 obtenues pour les deux souches. La souche de bactérie testée est considérée comme étant une souche à effet marqué si la moyenne des taux d'IGF-1 du groupe monoxénique n'est pas significativement différente de la moyenne pour le groupe WJL avec une
10 valeur de p supérieure à 0,05, dans le test statistique de Tukey. L'effet est fort si ladite moyenne pour la souche à tester est significativement supérieure à la moyenne pour la souche WJL lorsque la valeur de p est inférieure ou égale à 0,05. L'effet est qualifié d'intermédiaire si ladite moyenne pour la souche à tester (préalablement qualifiée sur le test axénique précédent) est significativement inférieure à la moyenne
15 pour la souche WJL lorsque la valeur de p est inférieure ou égale à 0,05. La composition selon l'invention comprendra donc de préférence une souche de bactérie ayant un tel effet marqué ou fort, et en particulier cette souche de bactérie a un effet marqué ou fort à la fois sur la croissance squelettique et sur le taux sérique d'IGF-1.

La composition selon l'invention, comprenant au moins une souche de
20 bactérie conforme à l'invention, est apte à une utilisation comme médicament ou probiotique destiné à favoriser la croissance juvénile en cas de malnutrition, notamment avec carence protéique. Suivant une caractéristique de l'invention, le sujet à traiter, malnutri ou ayant été malnutri, peut avoir un taux sérique d'IGF-1 inférieur à celui rencontré chez des individus de même âge et sexe et non mal
25 nourris.

La composition est utilisable chez l'homme de la naissance à la puberté.

La composition est utilisable chez les animaux de rente (bovins, ovins, caprins, porcins, aviaire), les animaux de compagnie (chien, chat) et de sport (cheval, dromadaire, chameau), entre le sevrage et la maturité sexuelle.

30 La composition contient une quantité de 10^5 à 10^{12} , notamment de 10^6 à 10^{12} , de préférence de 10^8 à 10^{12} cellules bactériennes formant des colonies (CFU) selon l'invention, par gramme de composition. Le terme CFU signifie « colony forming units » selon l'expression technique anglaise. Par gramme de composition, on entend de préférence la composition pharmaceutique ou la composition probiotique formée
35 des bactéries, co-ingrédients, et excipients ou vecteurs. Par cellules bactériennes, on entend une souche de bactérie unique conforme à l'invention ou un mélange d'au moins deux bactéries, conformes à l'invention.

La composition comprend la ou les bactéries lactiques sous forme vivante. Il peut s'agir d'une suspension bactérienne, qui peut être congelée et décongelée avant usage, ou encore une poudre lyophilisée, pouvant être utilisée telle quelle ou après reprise dans un véhicule approprié. Elle peut alors comprendre un excipient de lyophilisation classique.

La composition peut être une forme d'administration orale (par exemple poudre, gélule, comprimé) éventuellement sous une forme gastro-protégée permettant de passer l'estomac et libérer les bactéries dans l'intestin.

L'invention a aussi pour objet une méthode de traitement probiotique ou de traitement thérapeutique pour favoriser la croissance juvénile en cas de malnutrition, comprenant l'administration à un patient, humain (de la naissance à la puberté) ou animal (du sevrage à la maturité sexuelle), qui en a besoin, c'est-à-dire malnutri ou ayant subi une période de malnutrition, notamment avec carence protéique, d'une composition selon l'invention. Le patient qui en a besoin peut avoir un taux sérique d'IGF-1 inférieur à celui rencontré chez des individus de même âge et sexe et non mal nourris.

Comme il est indiqué, la méthode peut être un traitement thérapeutique ou un traitement probiotique (ou de complément nutritionnel). La méthode comprend l'administration d'une quantité suffisante d'une composition telle que décrite ci-dessus. La quantité et la fréquence d'administration dépendront notamment de la sévérité de la malnutrition, de l'âge et de l'état du patient. La méthode comprendra l'administration en une ou plusieurs fois, pouvant être échelonnée sur la période de croissance du sujet (jusqu'à la puberté ou la maturité sexuelle), de doses de composition selon l'invention. Les doses peuvent être fractionnées pour faciliter l'administration, notamment en fonction de l'âge du patient. La fréquence d'administration est notamment comprise entre une dose (unique ou fractionnée) tous les jours et une dose tous les mois. Typiquement, la fréquence d'administration sera comprise entre une dose (unique ou fractionnée) tous les jours et une dose toutes les semaines, voire tous les 2, 3, 4, 5 ou 6 jours. Chaque dose (unique ou fractionnée) représente notamment plusieurs grammes à plusieurs dizaines de gramme de composition. La méthode comprend notamment l'administration d'une composition comprenant une quantité de 10^5 à 10^{12} , notamment de 10^6 à 10^{12} , de préférence de 10^8 à 10^{12} cellules bactériennes formant des colonies CFU par gramme de composition (par cellules bactériennes, on entend une souche de bactérie unique conforme à l'invention ou un mélange d'au moins deux bactéries, conformes à l'invention). La méthode comprend notamment l'administration d'une composition comprenant la ou les bactéries lactiques sous forme vivante. Cette composition peut

être une suspension bactérienne, qui peut être congelée et décongelée avant usage, ou encore une poudre lyophilisée, pouvant être utilisée telle quelle ou après reprise dans un véhicule approprié. Cette composition peut alors comprendre un excipient de lyophilisation classique, être une forme d'administration orale (par exemple poudre, 5 gélule, comprimé) éventuellement sous une forme gastro-protégée permettant de passer l'estomac et libérer les bactéries dans l'intestin, ou encore une forme rectale (par exemple suppositoire).

Dans un mode de réalisation, la composition selon l'invention, notamment la composition utilisée dans la méthode de traitement, comprend au moins une souche 10 de bactérie qui n'est pas naturellement présente (« not-naturally occurring ») chez l'espèce à laquelle le patient à traiter appartient. Ainsi, il peut s'agir d'une bactérie qui n'est pas naturellement présente chez l'homme ou chez l'animal. Dans cette configuration, lorsqu'il y a plusieurs bactéries différentes, il suffit que l'une d'elles ne soit pas naturellement présente. En revanche, cette bactérie s'avère avoir un 15 tropisme intestinal chez le patient à traiter ou dans l'espèce correspondante (homme ou animal selon l'invention) et répond à la définition des souches actives selon l'invention.

L'invention concerne aussi une méthode de criblage de bactéries capables de favoriser la croissance juvénile en cas de malnutrition, utilisant un modèle de 20 drosophile axénique et/ou un modèle de souris axénique.

La méthode avec le modèle drosophile comprend les étapes suivantes :

- on dispose d'un lot d'embryons issus de *Drosophila melanogaster* (e.g. souche *Drosophila yw* ou tout autre souche dite "sauvage") axéniques ;
- on répartit ces embryons en au moins 2 groupes sur un milieu nutritionnel 25 comprenant un milieu nutritif pour drosophiles carencé en levure, l'un des groupes d'embryons est en outre inoculé par une suspension de la bactérie à tester, ce qui forme le groupe des individus monoxéniques ; l'autre groupe forme le groupe axénique,
- on conduit l'élevage à température appropriée (généralement environ 25 °C),
- 30 - au terme d'une période d'élevage appropriée (généralement environ 7j), on récupère, de préférence en nombre égal, les larves de drosophiles de chaque groupe issues des embryons initialement inoculés ou non (larves axéniques et larves monoxéniques),
- on détermine la moyenne de la longueur des larves de chacun des groupes, et on 35 compare les moyennes obtenues ;
- la souche de bactérie testée est considérée comme répondant positivement au test si la moyenne de la longueur des larves du groupe monoxénique est

supérieure à la moyenne de la longueur des larves du groupe axénique avec une valeur de p inférieure ou égale à 0,001, de préférence inférieure ou égale à 0,0001 dans le test statistique de Mann-Whitney, réalisé sur l'ensemble du jeu de données des tailles des larves des deux groupes.

5 De préférence, la méthode de criblage reprend les caractéristiques du test drosophile qui a été décrit plus haut.

La méthode avec le modèle souris comprend les étapes suivantes :

- on dispose de juvéniles issues de deux lignées issues d'une même souche de souris (typiquement souris Balb/c), à savoir une lignée de souris parentales axéniques et une lignée de souris parentales monoxéniques (associées à la bactérie à tester),
- on les élève en régime nutritionnel carencé en protéines et de préférence aussi en lipides,
- au terme d'une période d'élevage appropriée, on détermine la moyenne des valeurs d'un ou plusieurs paramètres de chaque groupe, ces paramètres étant liés à la croissance (par exemple prise de poids, croissance squelettique par exemple par mesure de la taille des individus ou de la taille de leurs fémurs), et/ou au taux d'IGF-1 sérique,
- la souche de bactérie lactique est considérée comme répondant positivement au test si la valeur moyenne du paramètre mesuré du groupe monoxénique est supérieure à la valeur moyenne du paramètre mesuré du groupe axénique avec une valeur de p inférieure ou égale à 0,05 dans le test statistique de Tukey.

De préférence, la méthode de criblage reprend les caractéristiques du test souris croissance squelettique ou taux sérique d'IGF-1 décrit ci-dessus.

25 La méthode de criblage peut aussi être un test comparatif avec une souche de référence, par exemple la souche WJL, et ce test reprend alors les caractéristiques décrites ci-dessus pour les tests drosophile ou souris.

30 L'invention va être maintenant décrite plus en détail à l'aide de modes de réalisation de l'invention pris à titre d'exemples non limitatifs et se référant au dessin dans lequel :

- la figure 1 est un graphique montrant le taux de croissance (en cm/jour) de souris de J28 à J56 ; GF : souris axéniques ; WJL : souris élevées en présence de la souche *L. plantarum* WJL ; NIZO 2877 : souris élevées en présence de la souche *L. plantarum* WJL NIZO 2877 ; * p<0,05 ; ***p<0,001 ;
- 35 - la figure 2 est un graphe montrant la taille des fémurs à J56, chez des souris GF, WJL ou NIZO 2877 ; * p<0,05 ; ***p<0,001 ; et

- la figure 3 est un graphe montrant les taux sériques (en ng/ml) de souris males à J56, groupes GF, WJL ou NIZO 2877* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Exemple 1 : Criblage fonctionnel de bactéries sur *Drosophila* monoxénique :

5 J-1 : on emploie des Drosophiles adultes (*D. melanogaster yw*) axéniques ; elles sont placées dans des cages de ponte comportant un fond (type boîte de Pétri) sur lequel est disposé un milieu nutritionnel conventionnel ; la ponte est assurée par le maintien de la population d'adultes dans la cage 1 nuit à 25°C.

10 J0 : on découpe 6 pièces du milieu nutritionnel de manière à recueillir 6 fois 40 embryons, on place chacune des pièces sur un milieu nutritionnel carencé contenu dans une boîte de Pétri, on inocule trois boîtes avec du PBS 1x stérile puis les trois autres avec une suspension de la bactérie dans du PBS 1x

On incube 7 jours à 25°C.

15 J7 : On récupère ensuite, à partir de chaque boîte, les larves qui s'y sont développées (l'expérience est exploitable à partir de 20 larves par boîte, nous avons donc ci-après utilisé des groupes de plus de 60 individus). Les larves subissent un traitement thermique choc (5 secondes sur une plaque chauffée à 100°C), on mesure ensuite la taille des larves.

On a appliqué ce protocole à différentes souches de bactéries, et les expériences et résultats sont résumés dans le tableau 1 suivant :

	Tailles des larves à J7 (mm)		Analyse statistique				Interprétation du test qualitatif quantitatif)
	Moyenne (n>60, mm)	Ecart-type	Comparaison/animaux axéniques		Comparaison/ <i>L. plantarum</i> WJL		
			Valeur de p (1)	Signification statistique	Valeur de p (1)	Signification statistique	
<i>L. plantarum</i> WJL	2,693	0,497			<0,0001	****	
<i>L. plantarum</i>	3,644	0,883	<0,0001	****			SPM (marqué)
	3,398	0,750	<0,0001	****	0,0001	***	SPM (intermédiaire)
<i>L. casei</i> ATCC 393	4,391	0,802	<0,0001	****	0,0721	ns	SPM (marqué)
<i>L. fermentum</i>	4,133	0,824	<0,0001	****	>0,9999	ns	SPM (marqué)
<i>L. fermentum</i> KLD	2,741	0,626	>0,9999	ns	<0,0001	****	Pas d'effet sur la croissance
<i>L. fermentum</i> LMG	3,287	0,799	0,1423	ns	0,0015	**	Pas d'effet sur la croissance
<i>L. paracasei</i> ATCC	3,987	0,524	<0,0001	****	0,4258	ns	SPM (marqué)
<i>L. paracasei</i> BL23	2,682	0,482	>0,9999	ns	<0,0001	****	Pas d'effet sur la croissance
<i>L. paracasei</i>	3,407	0,779	<0,0001	****	0,0984	ns	SPM (marqué)
<i>L. delbrueckii</i>	2,540	0,599	>0,9999	ns	<0,0001	****	Pas d'effet sur la croissance
<i>L. casei</i> ATCC 11842							
<i>L. casei</i> L919	4,150	0,712	<0,0001	****	0,2966	ns	SPM (marqué)
<i>L. rhamnosus</i> L900	3,920	0,572	<0,0001	****	>0,9999	ns	SPM (marqué)
<i>L. rhamnosus</i> L908	4,112	0,576	<0,0001	****	0,1227	ns	SPM (marqué)
<i>L. rhamnosus</i> GG	4,036	0,488	<0,0001	****	0,5272	ns	SPM (marqué)
			*Significativement supérieur à la valeur de références		*Significativement inférieur à la valeur de références		SPM = Souche promotrice de croissance

(1) Test statistique utilisé : test Mann-Whitney.

Indications sur les critères de validation du test phénotypique "croissance larvaire" :

La souche doit remplir au minimum le critère 1 pour être validée et l'ampleur de son activité peut être qualifiée selon le critère 1+2.

5 Critère 1 qualitatif = souche promotrice de croissance par rapport à la condition axénique :

Un test statistique est appliqué à l'ensemble des valeurs de longueur des individus associés par rapport aux valeurs des individus axéniques (60 larves au minimum par condition). Une valeur p inférieure à 0,001 (test Mann-Whitney) qualifie la souche de
10 "promotrice de croissance". Dans le cas présent les souches suivantes sont qualifiées de promotrice de croissance :

Lactobacillus plantarum WJL

Lactobacillus plantarum NIZO2877

Lactobacillus casei ATCC 393

15 *Lactobacillus fermentum ATCC 9338*

Lactobacillus paracasei ATCC 25302

Lactobacillus paracasei Shirota

Lactobacillus casei L919

Lactobacillus rhamnosus L900

20 *Lactobacillus rhamnosus L908*

Lactobacillus rhamnosus GG

Les souches suivantes ne présentent pas d'effet promoteur de croissance :

Lactobacillus fermentum KLD

Lactobacillus fermentum LMG

25 *Lactobacillus paracasei BL23*

Lactobacillus delbrueckii spp.bulgaricus ATCC 11842

Critère 2 quantitatif = ampleur de l'effet de promotion de croissance (avec le critère 1 validé préalablement) :

30 Un test statistique est appliqué à l'ensemble des valeurs de longueur des individus associés à la ou les souches testées par rapport aux valeurs des individus mono-associés à la souche *L. plantarum WJL* (60 larves au minimum par condition).

Trois cas de figures se présentent :

La valeur p du test statistique est supérieure à 0,001 (test Mann-Whitney), la souche
35 sera qualifiée d'un effet "marqué" sur la croissance larvaire (effet similaire à la souche *L. plantarum WJL*).

Dans l'exemple présent les souches suivantes ont un effet marqué :

Lactobacillus casei ATCC 393

Lactobacillus fermentum ATCC 9338

Lactobacillus paracasei ATCC 25302

Lactobacillus paracasei Shirota

Lactobacillus casei L919

Lactobacillus rhamnosus L900

5 *Lactobacillus rhamnosus* L908

Lactobacillus rhamnosus GG

Lactobacillus plantarum WJL

10 La valeur p du test statistique est inférieure à 0,001 (test Mann-Whitney), la souche sera qualifiée d'un effet "intermédiaire" sur la croissance larvaire si la taille moyenne des individus est inférieure à celles des individus associés à *L. plantarum* WJL (cas de la souche *L. plantarum* NIZO 2877 dans l'exemple présenté). La souche sera qualifiée d'un effet "fort" si la taille moyenne des individus est supérieure à celles des individus associés à *L. plantarum* WJL (cas non identifié dans l'exemple présent).

15 **Analyse de l'exemple de test phénotypique "croissance larvaire" :**

- 14 souches de *Lactobacillus* ont été testées (Tableaux 1) afin de déterminer leur potentiel de promotion de croissance à l'aide du test de "croissance larvaire" chez *Drosophila melanogaster*.

20 - Ces souches sont disponibles à l'ATCC, à l'Institut Pasteur de Paris, à l'Institut Pasteur de Lille ou publié dans la littérature scientifique et disponible auprès des chercheurs référents des publications mentionnées (Tableau 2).

:

	Collection publique et/ou publication avec séquence du génome
<i>s plantarum WJL</i>	Kim et al., Genome Announc. 21 novembre 2013, 1(6).Pil : e00937-13
<i>s plantarum NIZO2877</i>	NIZO (2877)
<i>s casei ATCC 393</i>	ATCC (393)
<i>s fermentum ATCC 9338</i>	ATCC (9338)
<i>s fermentum KLD</i>	Institut Pasteur de Lille (A5.20)
<i>s fermentum LMG</i>	Institut Pasteur de Lille (A5.16)
<i>s paracasei ATCC 25302</i>	ATCC (25302)
<i>s paracasei BL23</i>	Institut Pasteur de Lille (A3.6) et Mazé et al., J. Bacteriol., Mai 2010; 192(10) :2647-8
<i>s paracasei Shirota</i>	Institut Pasteur de Lille (A3.5)
<i>s delbrueckii spp.bulgaricus</i>	ATCC (11842) et van de Guchte M, et al., Proc.Natl Acad Sci USA 13 juin 2006
<i>s casei L919</i>	Koryszewska-Baginska A et al., Genome Announc, 26 septembre 2013
<i>s rhamnosus L900</i>	Aleksandrzak-Piekarczyk T et al. Genome Announc , 15 août 2013
<i>s rhamnosus L908</i>	Koryszewska-Baginska A et al. Genome Announc, 20 février 2014
<i>s rhamnosus GG</i>	ATCC (53103) et Kankainen M et al., Proc Natl Acad Sci USA, 6 octobre 2009

- La taille d'un minimum de 60 individus par condition est étudiée au jour 7 après association avec la souche bactérienne à tester, puis élevage des individus juvéniles en milieu nutritionnel carencé en levure. Le tableau 1 présente la moyenne et l'écart-type de ces jeux de données.

5 - L'analyse statistique de ces résultats permet de qualifier selon le critère 1 du "test de croissance larvaire" 10 souches de différentes espèces de *Lactobacilles*. Cette sélection met en lumière un effet fonctionnel strictement souche spécifique et pas nécessairement lié à une espèce donnée de Lactobacille.

10 - L'analyse statistique des résultats permet selon le critère 2, de qualifier d'"intermédiaire" l'effet de la souche *L. plantarum NIZO 2877* alors que les 9 autres souches promotrices de croissance présentent des effets "marqués".

Exemple 2 : Criblage fonctionnel de bactéries sur souris - analyse phénotypique :

Etude chez la souris de l'effet promoteur de croissance juvénile de deux souches à effet "intermédiaire" et "marqué" (*L. plantarum NIZO2877* et *L. plantarum WJL*, respectivement) identifié à l'aide du test "croissance larvaire" de l'exemple 1.

15 La descendance male (minimum 15 individus) de trois groupes d'individus issus d'une même colonie de souris axénique a été étudiée, le premier groupe consiste en des juvéniles axéniques (groupe GF), le deuxième en des juvéniles issus de parents mono-associés avec la souche *L. plantarum WJL* (groupe WJL), et le troisième en des juvéniles issus de parents mono-associés avec la souche *L. plantarum NIZO2877* (groupe NIZO 2877). Les parents et juvéniles sont élevés en milieu nutritionnel conventionnel jusqu'au sevrage des juvéniles (J21), puis les juvéniles sevrés sont élevés en milieu nutritionnel carencé en protéines et en lipides (8% et 2.5% respectivement) jusqu'à J56.

Milieu nutritionnel conventionnel : 23% protéines et 5% lipides

25 Milieu nutritionnel carencé : 8% protéines et 2,5% lipides

Trois paramètres illustrant la croissance juvénile de ces individus ont été étudiés : (1) la prise de taille pendant une période de 28 jours suivant le sevrage (de J28 à J56), (2) la taille des fémurs d'un lot d'individus (au minimum 9 individus) représentatif de la population testée à J56 et enfin (3) le taux sérique à J56 du facteur de croissance IGF-1 chez au moins 8 individus.

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le test de Tukey en utilisant le logiciel GraphPad (GraphPad Prism 5.04, San Diego, USA) ; valeurs de $p < 0.05$ sont considérées significatives.

(1) Prise de taille :

35 Les souris ont été anesthésiées par brève exposition à l'isoflurane pour permettre la mesure de la taille des souris (du museau à la base de la queue) à J28 et J56.

Tableau 3 : taux de croissance (prise de taille par jour en cm de J28 à J56) – Nb = nombre de souris

GF			WJL			NIZO 2877		
Moyenne	Ecart-type	Nb	Moyenne	Ecart-type	Nb	Moyenne	Ecart-type	Nb
0,007321	0,009878	15	0,031114	0,009376	17	0,016429	0,011071	25

Ces données sont réunies sur la Figure 1.

(2) Taille des fémurs :

- 5 Les souris sont sacrifiées à J56, un fémur est prélevé, libéré du muscle et sa longueur est mesurée au caliper Vernier.

Tableau 4 : Longueur des fémurs en mm à J56 chez les mâles

GF	WJL	NIZO 2877
10,2	11,2	10,9
10,2	11,6	11
10,5	11,9	10,5
9,9	11,6	11,2
10,4	12	11
10	11,4	11
10,2	12	11
10, 2	11,7	11,2
9,8	12	11
	11,9	
	11,6	
	11	

Ces données sont réunies sur la Figure 2.

(3) Titres en IGF-1 dans le sérum :

- 10 Les titres en IGF-1 sont mesurés sur le sérum obtenu à partir du sang des souris sacrifiées à J56. La mesure est effectuée sur du sérum dilué (1:25) en utilisant le kit ELISA Ready-Set-Go (eBioscience, USA), en suivant les instructions du fabricant.

Tableau 5 : Titre sérique en IGF-1 en pg/ml (double mesure à partir des plaques ELISA)

GF		WJL		NIZO 2877	
4526,75	4343,75	8823,25	8606,5	7291,25	6998,75
2825,5	2614,75	9258,5	9122,25	5128	5102
2667,5	2773	8471,25	8660,5	4343,75	4396
3455,25	3219,5	7025,25	7078,25	5232,75	5180,5
7131,5	6839,5	11063	9557,3	8471,25	8282,5
2164,2	2057,55	15125	14409	4866,5	4761,75
3140,75	3035,75	10023	9372	6363,25	6152,25

2509	2456,15	11735	12026	7211,25	6680,5
2588,25	2614,75			4213,25	4161
4432,5	4601,3			4770,5	4517
4013,3	3930			4940,3	3846,5
3597,3	3846,5				

Ces données sont réunies sur la Figure 3.

Les résultats illustrent un effet "marqué" de la souche *L. plantarum WJL* sur le taux de croissance (valeur $p < 0.001$ par rapport à la condition axénique) et un effet "intermédiaire" de la souche *L. plantarum NIZO2877* (valeur $p < 0.05$ par rapport à la condition axénique et valeur $p < 0.001$ par rapport à la condition *L. plantarum WJL*). Ces effets sont confirmés avec le paramètre "taux d'IGF-1" (mêmes gammes de valeurs p des différents tests), puis renforcés avec le paramètre "taille des fémurs" (valeur $p < 0.001$ entre les conditions axénique et *L. plantarum NIZO 2877*)

L'ensemble de ces résultats démontre par la preuve scientifique l'effet promoteur de croissance juvénile de certaines souches de *Lactobacilles* répondant également positivement au test de "croissance larvaire".

Tous les documents publics cités ici sont incorporés par référence. De même, l'homme du métier pourra se référer à ces divers documents et aux dépôts de souches commerciales auxquels il est fait référence ici.

Revendications

1. Composition comprenant au moins une souche de *Lactobacillus* à tropisme intestinal, choisie parmi les espèces *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus casei*, pour une utilisation visant à favoriser la croissance juvénile en cas de malnutrition.

2. Composition selon la revendication 1, dans laquelle la souche de *Lactobacillus* est choisie parmi *L. plantarum* WJL, *L. casei* ATCC 393, *L. casei* L919, *L. fermentum* ATCC9338L

3. Composition selon la revendication 1 ou 2, dans laquelle la souche de *Lactobacillus* répond positivement au test suivant :

- on dispose d'un lot d'embryons de parents *Drosophila melanogaster* axéniques ;

- à J1 : on répartit ces embryons en au moins 2 groupes (40 embryons, réalisé en triplicat soit 120 embryons par groupe) sur un milieu nutritionnel comprenant de la farine de maïs, de l'agar et de l'eau, carencé en levure, l'un des groupes d'embryons est en outre inoculé par une suspension d'environ 10^8 CFU de la bactérie à tester dans un tampon salin, ce qui forme le groupe monoxénique, l'autre groupe étant le groupe axénique, on conduit l'élevage des deux groupes à environ 25°C jusqu'à J7 ;

- à J7 : on récupère au minimum 60 larves de drosophiles de chaque groupe, on leur applique un choc thermique;

- on détermine la moyenne de la longueur des larves de chacun des groupes, et on compare les moyennes obtenues ;

- la souche de bactérie testée est considérée comme répondant positivement au test si la moyenne de la longueur des larves du groupe monoxénique est supérieure à la moyenne de la longueur des larves du groupe axénique avec une valeur de p inférieure ou égale à 0,001, de préférence inférieure ou égale à 0,0001 dans le test statistique de Mann-Whitney, réalisé sur l'ensemble du jeu de données des tailles des larves des deux groupes.

4. Composition selon la revendication 3, comprenant une souche de bactérie qui, par rapport à la souche *L. plantarum* WJL, dans ce même test sur drosophile, a un effet fort avec une moyenne de la longueur des larves du groupe monoxénique avec cette souche de bactérie significativement supérieure à la moyenne pour le groupe monoxénique avec la souche WJL, lorsque la valeur de p est inférieure ou égale à 0,0001 dans le test statistique de Mann-Whitney, réalisé sur l'ensemble du jeu de données des tailles des larves des deux groupes.

5. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans laquelle la souche de *Lactobacillus* répond positivement au test suivant :

- à partir d'une même lignée de souris on établit une lignée de souris parentales axéniques et une lignée de souris parentales monoxéniques (associées à la bactérie à tester), et l'on produit des juvéniles qui sont élevées avec les parents en milieu nutritionnel conventionnel jusqu'à leur sevrage (J21)

- à J21 : on dispose de 8 juvéniles sevrées issues de chacune de ces deux lignées, formant le groupe monoxénique et le groupe axénique, et on les élève en régime nutritionnel carencé en protéines (8%) et en lipides (2,5%);

- à J 56 : on détermine la moyenne des tailles des souris pour chaque groupe considéré par la mesure de l'extrémité du museau à la base de la queue de chaque individu, ou l'on prélève les fémurs des individus de chaque groupe et l'on mesure ces derniers ;

- la souche de bactérie lactique étant considérée comme répondant positivement au test si la taille moyenne des individus ou des fémurs du groupe monoxénique est supérieur à la taille moyenne des individus ou des fémurs, du groupe axénique, avec une valeur de p inférieure ou égale à 0,05 dans le test statistique de Tukey.

6. Composition selon la revendication 5, comprenant une souche de bactérie qui, par rapport à la souche *L. plantarum* WJL, dans ce même test sur souris, a un effet fort avec une moyenne de la taille des souris ou de leurs fémurs du groupe monoxénique avec cette souche de bactérie significativement supérieure à la moyenne pour le groupe monoxénique avec la souche WJL, lorsque la valeur de p est inférieure ou égale à 0,05 dans le test statistique de Tukey.

7. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, dans laquelle la souche de *Lactobacillus* répond positivement au test suivant :

- à partir d'une même lignée de souris axéniques on établit une lignée de souris parentales axéniques et une lignée de souris parentales monoxéniques (associées à la bactérie à tester), et l'on produit des juvéniles qui sont élevées avec les parents en milieu nutritionnel conventionnel jusqu'à leur sevrage (J21),

- à J21 : on dispose de 8 juvéniles sevrées issues de chacune de ces deux lignées, formant le groupe monoxénique et le groupe axénique, et on les élève en régime nutritionnel carencé en protéines (8%) et en lipides (2,5%);

- à J 56 : on prélève du sang des juvéniles de chaque groupe et on détermine le taux sérique moyen d'IGF-1 pour chaque groupe ;

- la souche de bactérie lactique étant considérée comme répondant positivement au test si le taux sérique moyen d'IGF-1 du groupe monoxénique est

supérieur au taux sérique moyen du groupe axénique avec une valeur de p inférieure ou égale à 0,05 dans le test statistique de Tukey.

5 8. Composition selon la revendication 7, comprenant une souche de bactérie qui, par rapport à la souche *L. plantarum* WJL, dans ce même test sur souris, a un effet fort avec une moyenne de taux sérique d'IGF-1 du groupe monoxénique avec cette souche de bactérie significativement supérieure à la moyenne pour le groupe monoxénique avec la souche WJL, lorsque la valeur de p est inférieure ou égale à 0,05 dans le test statistique de Tukey.

10 9. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, pour utilisation comme médicament ou probiotique destiné à favoriser la croissance juvénile en cas de malnutrition caractérisé par une carence protéique.

15 10. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, pour utilisation comme médicament ou probiotique destiné à favoriser la croissance juvénile en cas de malnutrition caractérisée par un taux sérique d'IGF-1 inférieur à la normale.

11. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle la bactérie est un *Lactobacillus plantarum*.

20 12. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, contenant de 10^5 à 10^{12} CFU de *Lactobacillus* répondant positivement au test, par gramme de composition.

13. Méthode de criblage de bactéries capables de favoriser la croissance juvénile en cas de malnutrition, dans laquelle la souche de bactérie est soumise au test suivant :

- 25 - on dispose d'un lot d'embryons de parents de *Drosophila melanogaster* axéniques ;
- on place ces embryons en au moins 2 groupes sur un milieu nutritionnel comprenant un milieu nutritif pour drosophiles carencé en levure, l'un des groupes d'embryons est en outre inoculé par une suspension de la bactérie à tester, ce qui forme le groupe des individus monoxéniques ; l'autre groupe forme le groupe axénique,
- 30 - on conduit l'élevage à température appropriée,
- au terme d'une période d'élevage appropriée, on récupère, de préférence en nombre égal, des larves de drosophiles de chaque groupe (larves axéniques et larves monoxéniques),
- on détermine la moyenne de la longueur des larves de chacun des groupes, et on compare les moyennes obtenues ;
- 35 - la souche de bactérie testée est considérée comme répondant positivement au test si la moyenne de la longueur des larves du groupe monoxénique est supérieure à

la moyenne de la longueur des larves du groupe axénique avec une valeur de p inférieure ou égale à 0,001, de préférence inférieure ou égale à 0,0001 dans le test de Mann-Whitney, réalisé sur l'ensemble du jeu de données.

5 14. Méthode de criblage de bactéries capables de favoriser la croissance juvénile en cas de malnutrition, dans laquelle la souche de bactérie est soumise au test suivant :

- on dispose de juvéniles issues de deux lignées issues d'une même souche de souris, à savoir une lignée de souris axéniques et une lignée de souris monoxéniques,
- 10 - on les élève en régime nutritionnel carencé en protéines et de préférence aussi en lipides ;
- au terme d'une période d'élevage appropriée, on détermine la moyenne des valeurs d'un ou plusieurs paramètres de chaque groupe, ces paramètres étant liés au taux d'IGF-1 sérique ou à la croissance,
- 15 - la souche de bactérie lactique est considérée comme répondant positivement au test si le taux moyen d'IGF-1 du groupe monoxénique est supérieur au taux moyen du groupe axénique avec une valeur de p inférieure ou égale à 0,05 dans le test statistique Tukey.

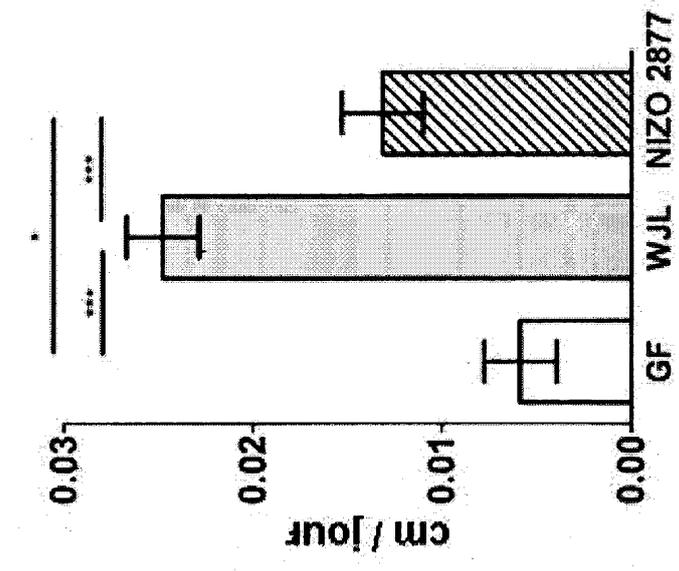


Figure 1

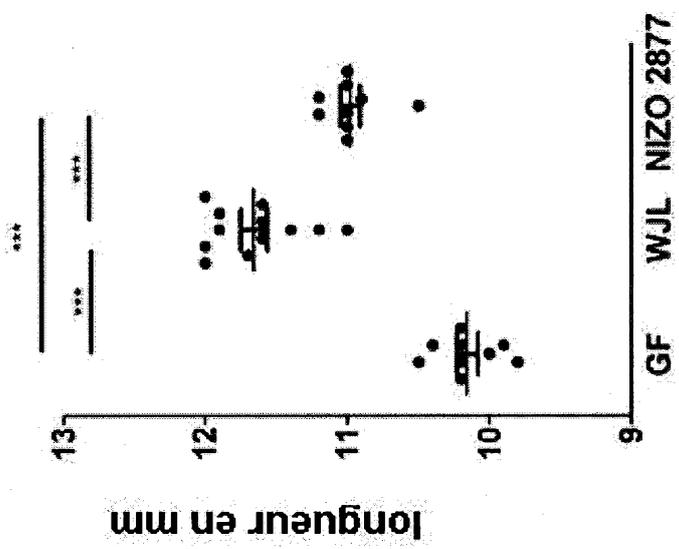


Figure 2

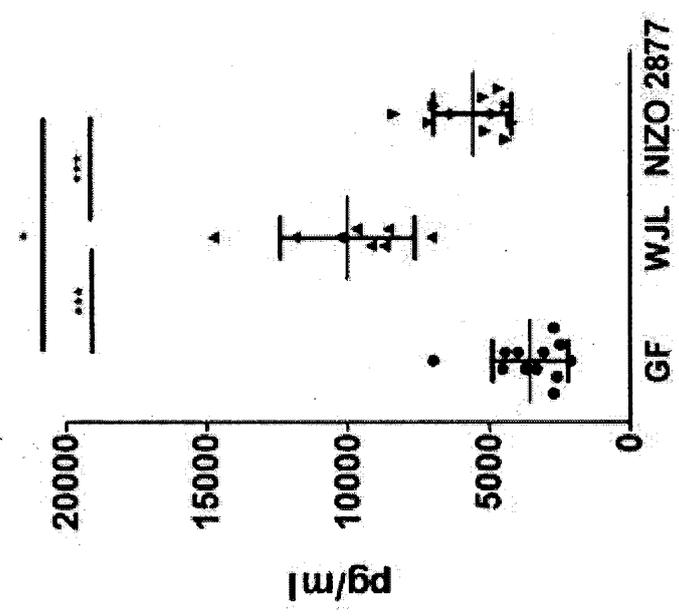


Figure 3

RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-17 et R.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

L'I.N.P.I. annexe à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention, au sens des articles L. 611-11 (nouveau) et L. 611-14 (activité inventive) du code de la propriété intellectuelle. Ce rapport porte sur les revendications du brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

CONDITIONS D'ÉTABLISSEMENT DU PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

- Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.
- Le demandeur a maintenu les revendications.
- Le demandeur a modifié les revendications.
- Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.
- Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.
- Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITÉS DANS LE PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

- Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.
- Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.
- Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.
- Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

1. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION

WO 2013/057063 A1 (NESTEC SA [CH])
25 avril 2013 (2013-04-25)

WO 2013/191845 A1 (MJN US HOLDINGS LLC [US])
27 décembre 2013 (2013-12-27)

AGUSTINA RINA ET AL: "Probiotics Lactobacillus reuteri DSM 17938 and Lactobacillus casei CRL 431 Modestly Increase Growth, but Not Iron and Zinc Status, among Indonesian Children Aged 1-6 Years", JOURNAL OF NUTRITION, vol. 143, no. 7, juillet 2013 (2013-07), pages 1184-1193, XP002735351,

OBERHELMAN R A ET AL: "A placebo-controlled trial of Lactobacillus GG to prevent diarrhea in undernourished Peruvian children", JOURNAL OF PEDIATRICS, MOSBY-YEAR BOOK, ST. LOUIS, MO, US, vol. 134, no. 1, 1 janvier 1999 (1999-01-01), pages 15-20, XP027487370, ISSN: 0022-3476, DOI: 10.1016/S0022-3476(99)70366-5 [extrait le 1999-01-01]

WANG J ET AL: "Lactobacillus plantarum ZLP001: In vitro Assessment of Antioxidant Capacity and Effect on Growth Performance and Antioxidant Status in Weaning Piglets", ASIAN-AUSTRALASIAN JOURNAL OF ANIMAL SCIENCES, vol. 25, no. 8, août 2012 (2012-08), pages 1153-1158, XP002735352,

SON V M ET AL: "Dietary administration of the probiotic, Lactobacillus plantarum, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper Epinephelus coioides", FISH AND SHELLFISH IMMUNOLOGY, ACADEMIC PRESS, LONDON, GB, vol. 26, no. 5, 1 mai 2009 (2009-05-01), pages 691-698, XP026097888, ISSN: 1050-4648, DOI: 10.1016/J.FSI.2009.02.018 [extrait le 2009-03-03]

DATABASE EMBASE [Online] ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL; 1994, GONZALEZ S N ET AL: "Biotherapeutic role of fermented milk", XP002735353, Database accession no. EMB-1996012348 & GONZALEZ S N ET AL: "Biotherapeutic role of fermented milk", BIOTHERAPY 1994 NL, vol. 8, no. 2, 1994, pages 129-134, ISSN: 0921-299X

ERKOSAR BERRA ET AL: "Host-Intestinal Microbiota Mutualism: "Learning on the Fly"", CELL HOST & MICROBE, vol. 13, no. 1, janvier 2013 (2013-01), pages 8-14, XP002735354,

GILLES STORELLI ET AL: "Promotes Systemic Growth by Modulating Hormonal Signals through TOR-Dependent Nutrient Sensing", CELL METABOLISM, CELL PRESS, UNITED STATES, vol. 14, no. 3, 14 juillet 2011 (2011-07-14), pages 403-414, XP028388621, ISSN: 1550-4131, DOI: 10.1016/J.CMET.2011.07.012 [extrait le 2011-08-10]

2. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE GENERAL

NEANT

**2. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN
TECHNOLOGIQUE GENERAL**

**3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND
DE LA VALIDITE DES PRIORITES**

NEANT