

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
29 octobre 2009 (29.10.2009)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2009/130423 A2

(51) Classification internationale des brevets :
C12N 1/20 (2006.01) *C12R 1/225* (2006.01)
A23C 9/123 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2009/000443

(22) Date de dépôt international :
16 avril 2009 (16.04.2009)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0802158 18 avril 2008 (18.04.2008) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
COMPAGNIE GERVAIS DANONE [FR/FR]; 17,
Boulevard Haussmann, F-75009 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :
CHAMBAUD, Isabelle [FR/FR]; 51, Boulevard Gallieni,
F-92130 Issy Les Moulineaux (FR). **KHLEBNIKOV, Artem** [RU/FR]; 105, avenue André Morizet, F-92100
Boulogne (FR). **VILLAIN, Anne-Catherine** [FR/FR]; 5,
avenue Henri Barbusse, F-92160 Juvisy Sur Orge (FR).
GROMPONE, Gianfranco [IT/FR]; 7, rue de l'Abbé de
l'Épée, F-75005 Paris (FR). **SAINT DENIS, Thierry**
[FR/FR]; 37, rue Charles Silvestri, F-94300 Vincennes
(FR). **DRUESNE, Anne** [FR/FR]; 8, impasse du fer à
cheval, F-91190 Villiers Le Bacle (FR). **SMOKVINA, Tamara** [FR/FR]; 7, Domaine du Séquoia, Rue des
Hucheries, F-91400 Orsay (FR).

(74) Mandataires : **VIALLE-PRESLES, Marie-José** et al.;
Cabinet Ores, 36, rue de Saint-Petersbourg, F-75008 Paris
(FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ,
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR,
KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME,
MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO,
NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport (règle 48.2.g))
- avec une (des) indication(s) relative(s) à du matériel
biologique déposé, fournie(s) selon la règle 13bis,
séparément, et non avec la description (règles
13bis.4.d)i) et 48.2.a) viii))
- avec la partie de la description réservée au listage des
séquences (règle 5.2.a))

(54) Title : NOVEL STRAIN OF LACTOBACILLUS PARACASEI SUBSPECIES PARACASEI HAVING ANTIMICROBIAL
AND IMMUNOMODULATORY PROPERTIES

(54) Titre : NOUVELLE SOUCHE DE LACTOBACILLUS PARACASEI SUBSP. PARACASEI DOTÉE DE PROPRIÉTÉS
ANTIMICROBIENNES ET IMMUNOMODULATRICES

(57) Abstract : The invention relates to a novel strain of *Lactobacillus paracasei subspecies paracasei*, having antimicrobial and
immunomodulatory properties, and to compositions containing said strain.

(57) Abrégé : L'invention concerne une nouvelle souche de *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* possédant des propriétés
anti-microbiennes et immunomodulatrices, ainsi que des compositions contenant ladite souche.



WO 2009/130423 A2

**NOUVELLE SOUCHE DE *LACTOBACILLUS PARACASEI* SUBSP. *PARACASEI*
DOTE DE PROPRIETES ANTIMICROBIENNES ET IMMUNOMODULATRICES**

L'invention est relative à une nouvelle souche de
5 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* dotée de propriétés
antimicrobiennes et immunomodulatrices.

De très nombreuses études scientifiques ont
rapporté les effets bénéfiques sur la santé de certains
microorganismes présents dans des aliments fermentés,
10 notamment des produits laitiers. Ces microorganismes sont
communément dénommés «probiotiques». Selon la définition
généralement admise à l'heure actuelle, les probiotiques sont
« des microorganismes vivants, qui lorsqu'ils sont consommés
en quantités adéquates, ont un effet bénéfique sur la santé
15 de l'hôte » (Rapport FAO/OMS sur l'évaluation des propriétés
sanitaires et nutritionnelles des probiotiques dans les
aliments, y compris le lait en poudre contenant des bactéries
lactiques vivantes ; Cordoba, Argentine ; 1-4 octobre 2001).

Il a été montré que la consommation de produits
20 alimentaires contenant des bactéries probiotiques peut
produire des effets favorables sur la santé, par
l'intermédiaire notamment du rééquilibrage de la flore
intestinale, de l'amélioration de la résistance aux
infections, et de la modulation de la réponse immunitaire.

25 Les microorganismes probiotiques utilisés en
alimentation humaine sont généralement des bactéries
lactiques, appartenant principalement aux genres
Lactobacillus et *Bifidobacterium*, et notamment à l'espèce
Lactobacillus paracasei subsp. *paracasei* (dont une souche
30 est décrite dans la Demande de brevet EP0794707).

Les effets bénéfiques sur la santé ne sont
toutefois généralement pas communs à l'ensemble des bactéries
d'un même genre, ni même d'une même espèce. Ils ne se
rencontrent, le plus souvent, que chez certaines souches ; en
35 outre, les effets observés peuvent varier qualitativement
et/ou quantitativement d'une souche probiotique à l'autre, y
compris à l'intérieur d'une même espèce.

Pour qu'un microorganisme puisse être considéré comme étant potentiellement utilisable comme probiotique, il doit satisfaire à au moins un, et idéalement plusieurs, des critères suivants :

- 5 - présenter une activité inhibitrice vis-à-vis de microorganismes pathogènes pouvant être présents dans la flore intestinale, cette activité pouvant résulter soit de la capacité à adhérer aux cellules intestinales, excluant ou réduisant ainsi l'adhérence des pathogènes, soit de la
- 10 capacité à produire des substances inhibant les pathogènes, soit de la combinaison de ces deux caractéristiques ;
- présenter des propriétés immunomodulatrices, et notamment immunostimulantes et/ou anti-inflammatoires.

15 En outre, si ce microorganisme est destiné à être incorporé dans un produit laitier, il doit de préférence présenter une croissance satisfaisante sur lait.

 Enfin, il doit conserver une bonne viabilité, au cours de la production et de la conservation de l'aliment dans lequel il est incorporé, ainsi qu'après l'ingestion de

20 cet aliment par le consommateur, de manière à pouvoir atteindre l'intestin et à survivre dans le milieu intestinal.

 Il est toutefois à noter que bien que la viabilité soit essentielle pour répondre à la définition

25 actuelle de « probiotique », il a été montré que certains des effets bénéfiques associés à des souches probiotiques pouvaient être obtenus même en l'absence de bactéries vivantes, et étaient attribuables à certaines fractions bactériennes ou à des fractions actives de leurs

30 surnageants de culture. Par exemple, la Demande PCT WO2004093898 décrit une préparation immunomodulatrice obtenue par fractionnement du surnageant de culture de la souche CNCM I-2219.

 Les Inventeurs sont maintenant parvenus à isoler

35 une nouvelle souche de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, et répondant aux critères indiqués ci-dessus.

 La présente invention a pour objet cette souche, qui a été déposée selon le Traité de Budapest, auprès de la

CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25 rue du Docteur Roux, Paris), le 9 novembre 2006, sous le numéro I-3689.

La souche CNCM I-3689 possède les caractéristiques suivantes:

- Morphologie : microorganisme Gram-positif, petits bacilles fins, isolés ou petites chaînes.

- Fermentation des sucres suivants (résultats obtenus sur une galerie api 50 CH - Milieu MRS API à 37°C pendant 48h): Ribose, galactose, D-glucose, D-fructose, D-mannose, mannitol, N-acétylglucosamine, arbutine, cellobiose, maltose, lactose, trehalose, melezitose, D-turanose, D-tagatose, gluconate.

- Présence d'un seul locus CRISPR de séquence SEQ ID NO : 1, contenant une séquence répétée représentée par la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 2.

Elle possède d'autre part des propriétés antimicrobiennes, se traduisant par une forte capacité à inhiber la croissance en culture de microorganismes pathogènes, notamment *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* et *Listeria monocytogenes*.

La souche CNCM I-3689 possède également des propriétés immunomodulatrices, et notamment anti-inflammatoires.

La présente invention englobe également pour objet des souches de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* susceptibles d'être obtenues par mutagenèse ou par transformation génétique de la souche CNCM I-3689. De préférence, ces souches conservent les propriétés antimicrobiennes et immunomodulatrices de la souche CNCM I-3689. Il peut s'agir de souches dans lesquelles un ou plusieurs des gènes endogènes de la souche CNCM I-3689 a (ont) été muté(s), par exemple de manière à modifier certaines de ses propriétés métaboliques (e.g. la capacité de cette souche à métaboliser des sucres, sa résistance au transit intestinal, sa résistance à l'acidité, sa post acidification ou sa production de métabolites). Il peut s'agir également de souches résultant de la transformation génétique de la

souche CNCM I-3689 par un ou plusieurs gène(s) d'intérêt, permettant par exemple de conférer à ladite souche des caractéristiques physiologiques supplémentaires, ou d'exprimer des protéines d'intérêt thérapeutique ou vaccinal, que l'on souhaite administrer par l'intermédiaire de ladite souche.

Ces souches peuvent être obtenues à partir de la souche CNCM I-3689 par les techniques classiques de mutagenèse aléatoire ou dirigée et de transformation génétique de lactobacilles, telles que celles décrites par exemple par GURY et al. (Arch Microbiol., 182, 337-45, 2004) ou par VELEZ et al. (Appl Environ Microbiol., 73, 3595-3604, 2007), ou par la technique dénommée « genome shuffling » (PATNAIK et al. Nat Biotechnol, 20, 707-12, 2002; Wang Y. et al., J Biotechnol., 129, 510-15, 2007). Ces souches possèdent en particulier un locus CRISPR de séquence SEQ ID NO : 1.

La présente invention a également pour objet un procédé d'obtention d'une souche de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* possédant des propriétés anti-microbiennes et/ou immunomodulatrices, comprenant une étape de mutagenèse ou de transformation génétique de la souche CNCM I-3689.

La présente invention a également pour objet un procédé d'obtention d'une fraction cellulaire possédant des propriétés anti-microbiennes et/ou immunomodulatrices à partir d'une souche de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* conforme à l'invention. Il s'agit notamment de préparations d'ADN ou de préparations de parois bactériennes obtenues à partir de cultures de ladite souche. Il peut s'agir également de surnageants de culture ou de fractions de ces surnageants.

La présente invention a également pour objet des compositions comprenant une souche de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* conforme à l'invention, ou une fraction cellulaire obtenue à partir de celle-ci.

Ces compositions peuvent être notamment des ferments lactiques, associant une souche de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* conforme à l'invention avec une ou plusieurs autre(s) souche(s) de bactéries lactiques,

probiotique(s) ou non. A titre d'exemple de souches de bactéries lactiques, on peut citer les souches *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*.

Il peut s'agir également de produits alimentaires, et notamment de produits laitiers, ou de produits pharmaceutiques ou cosmétiques comprenant une souche de *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* conforme à l'invention, ou une fraction cellulaire obtenue à partir de celle-ci.

Lorsque ladite souche est présente sous forme de bactéries vivantes, celles-ci seront de préférence présentes à raison d'au moins 10^5 ufc par gramme, avantageusement au moins 10^6 ufc par gramme de produit, plus avantageusement au moins 10^7 ufc par gramme et encore plus avantageusement au moins 10^8 ufc par gramme.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre qui se réfère à des exemples illustrant les propriétés antimicrobiennes, immunomodulatrices et anti-infectieuses de la souche CNCM I-3689, ainsi que le typage moléculaire de cette souche.

EXEMPLE 1 : COMPARAISON DES PROPRIETES DE LA SOUCHE CNCM I-3689 AVEC CELLES DE SOUCHES PROBIOTIQUES CONNUES

Les propriétés de la souche CNCM I-3689 ont été comparées avec celles de différentes souches de l'art antérieur, connues pour leurs propriétés probiotiques.

La liste de ces souches est donnée dans le Tableau I ci-dessous.

Tableau I

Genre	Espèce	Dénomination(s)	Numéro de publication de Demandes de Brevet
<i>Lactobacillus</i>	<i>johnsonii</i>	NCC533 = La1 = CNCM I-1225	EP0577903
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	NCFM	WO2004032639
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	La-5	
<i>Lactobacillus</i>	<i>casei</i>	Shirota	
<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	CRL431 = ATCC 55544	
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	LGG = ATCC 53103	US4839281
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	HN001 = NM97/09514	WO9910476
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	ATCC 14917= DSMZ 20174=WCFS1	
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	Probi 299v = DSM 9843	WO9391823
<i>Lactobacillus</i>	<i>reuteri</i>	DSMZ 20016	
<i>Lactobacillus</i>	<i>reuteri</i>	Biogaia SD 2112 = ATCC55730	WO2004034808
<i>Bifidobacterium</i>	<i>breve</i>	ATCC 15700	
<i>Bifidobacterium</i>	<i>breve</i>	BBC50 = CNCM I-2219	EP1189517
<i>Bifidobacterium</i>	<i>infantis</i>	ATCC 15697	
<i>Bifidobacterium</i>	<i>longum</i>	BB536	
<i>Bifidobacterium</i>	<i>longum</i>	NCC2705 = CNCM I-2618	
<i>Bifidobacterium</i>	<i>animalis</i> <i>subsp. lactis</i>	BB12 = ATCC 27536	
<i>Bifidobacterium</i>	<i>animalis</i> <i>subsp. lactis</i>	HN019 = NM97/01925	WO9910476

1- Activité antimicrobienne

La recherche d'activités anti-microbiennes a été effectuée contre trois bactéries pathogènes cibles : *Escherichia coli* E1392-75-2A, *Salmonella enteritidis* NIZO B1241 et *Listeria monocytogenes* 4B. Les bactéries lactiques ont été mises en culture sur boîtes de Petri dans deux milieux différents: milieu Elliker (ELLIKER et al., J. Dairy Sci., 39, 1611-1612, 1956), et milieu TGV (Tryptone-Glucose-Meat Extract).

Les boîtes sont incubées à 37°C jusqu'à apparition de colonies bactériennes. Les cultures de *Bifidobacterium* ont été effectuées sous anaérobiose. Une couche d'agar contenant du milieu BHI (brain-heart infusion) et le pathogène est alors coulée à la surface des boîtes. Les boîtes sont incubées de nouveau à 37°C pendant 24h. Les diamètres des zones d'inhibition du pathogène sont ensuite mesurés autour de chaque colonie de bactéries lactiques. Le score 1 correspond à un diamètre entre 1 et 3 mm. Le score 2 correspond à un diamètre entre 4 et 6 mm. Le score 3 correspond à un diamètre supérieur à 6 mm. Chaque expérience a été menée trois fois indépendamment pour chaque souche.

Les scores obtenus sur les pathogènes cibles dans chaque expérience ont été additionnés, pour obtenir, pour chaque bactérie lactique, un score global d'activité anti-microbienne.

Les résultats sont donnés dans le Tableau II ci-après.

Ces résultats montrent que parmi les souches testées, la souche CNCM I-3689 est avec la souche ATCC 55544 celle qui possède l'activité anti-microbienne la plus élevée.

Tableau II

Genre	Espèce	Référence	(1) E. coli/ Eliker	(2) Listeria/ Eliker	(3) Listeria/ TGV	(4) Salmonella /Eliker	(5) Salmonella /TGV	Score anti- pathogènes (1+2+3+4+5)
Lactobacillus	paracasei subsp. paracasei	DN 114121 = CNCM I-3689	3	3	2	3	2	13
<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	CRL431=ATCC55544	2	3	3	3	2	13
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	LGG = ATCC 53103	2	1	2	3	3	11
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	ATCC 14917= DSMZ 20174=WCFS1	2	1	2	3	2	10
<i>Lactobacillus</i>	<i>casei</i>	Shirota	2	3	1	1	2	9
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	HN001 = NM97/09514	1	1	2	3	2	9
<i>Lactobacillus</i>	<i>johnsonii</i>	NCC533=La1=I-1225	1	1	1	2	1	6
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	Probi 299v = DSM 9843	1	1	1	1	1	5
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	La-5	1	1	2	0	1	5
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	NCFM	1	1	1	0	1	4
<i>Bifidobacterium</i>	<i>animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	BB12 = ATCC 27536	1	0	0	0	2	3
<i>Lactobacillus</i>	<i>reuteri</i>	Biogaia SD 2112 ATCC55730	0	1	0	1	0	2
<i>Bifidobacterium</i>	<i>longum</i>	BB536	0	0	0	0	0	0
<i>Bifidobacterium</i>	<i>animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	HN019 = NM97/01925	0	0	0	0	0	0
<i>Lactobacillus</i>	<i>reuteri</i>	DSMZ 20016	0	0	0	0	0	0
<i>Bifidobacterium</i>	<i>infantis</i>	ATCC 15697	0	0	0	0	0	0
<i>Bifidobacterium</i>	<i>breve</i>	BBC50 = I-2219	0	0	0	0	0	0
<i>Bifidobacterium</i>	<i>breve</i>	ATCC 15700	0	0	0	0	0	0
<i>Bifidobacterium</i>	<i>longum</i>	NCC2705 = CNCM I-2618	0	0	0	0	0	0

2 - Immunomodulation

Les propriétés immunomodulatrices des différentes bactéries lactiques ont été évaluées par la mesure du ratio IL-10/IL-12.

5 Des prélèvements de sang humain, obtenus chez des sujets sains, ont été dilués à un ratio 1:2 avec du PBS-CA (GIBCO) et purifiés grâce à un gradient de Ficoll (GIBCO). Après une centrifugation à 400×g pendant 30 min à 20°C, les PBMC (« peripheral blood mononuclear cells ») ont été
10 prélevés. Trois étapes de lavage ont ensuite été effectuées, puis les PBMC ont été resuspendus dans un milieu de culture RPMI (GIBCO) supplémenté avec 1% de sérum de veau fœtal, 1% de L-glutamine (GIBCO) et 150 µg/ml de gentamycine (GIBCO). Les PBMC ont été comptés au microscope et ajustés à une
15 concentration de 2×10^6 cellules/ml, puis distribués (en aliquots de 1ml) dans des plaques 24-puits de cultures cellulaires (Corning, Inc.).

Les souches de *Lactobacillus* ont été cultivées en milieu MRS (DE MAN et al., J. Appl. Bacteriol. 23, 130-135,
20 1960), et les souches de *Bifidobacterium* en milieu MRS supplémenté avec 0.03 % de L-cystéine (Sigma) sous anaérobiose. Toutes les souches ont été incubées à une température de 37°C. La croissance des bactéries a été arrêtée en phase stationnaire, et les bactéries ont ensuite été lavées
25 et resuspendues à une concentration de 3 unités MacFarlan dans du PBS contenant 20% de glycérol.

Un volume de 10 µl de préparation bactérienne a été ajouté dans chaque puits des plaques contenant les PBMC (ratio bactéries:cellule 10:1). Les plaques ont été incubées pendant
30 24 h à 37°C sous une atmosphère contenant 5% de CO₂. Le surnageant a ensuite été aspiré, centrifugé à 2000 rpm et stocké à -20°C.

Les souches bactériennes contrôles, aux propriétés immunomodulatrices connues, ont été incluses dans le test. Du
35 PBS 20 % glycérol, sans bactéries, a également été utilisé comme contrôle négatif. L'expérience a été menée pour chaque souche sur des PBMCs issus de trois donneurs différents.

L'expression des cytokines a été mesurée par des tests ELISA en utilisant des kits commerciaux (Pharmingen, BD Biosciences). Deux cytokines ont été étudiées : IL-10 et IL-12.

- 5 Pour chaque souche testée, la moyenne du ratio IL-10/IL-12 a été calculée. Ces résultats sont rassemblés dans le Tableau III suivant.

Tableau III

Genre	Espèce	Référence	Ratio IL-10/IL-12
<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	DN 114121 = CNCM I-3689	11,8
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	Probi 299v = DSM 9843	12,7
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	La-5	23,5
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	NCFM	23,6
<i>Lactobacillus</i>	<i>johnsonii</i>	NCC533=La1=I-1225	23,7
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	ATCC 14917= DSMZ 20174=WCFS1	25,0
<i>Lactobacillus</i>	<i>reuteri</i>	Biogaia SD 2112 ATCC55730	25,4
<i>Bifidobacterium</i>	<i>longum</i>	BB536	26,4
<i>Bifidobacterium</i>	<i>animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	HN019 = NM97/01925	28,7
<i>Bifidobacterium</i>	<i>animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	BB12 = ATCC 27536	32,4
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	LGG = ATCC 53103	34,5
<i>Lactobacillus</i>	<i>reuteri</i>	DSMZ 20016	42,0
<i>Bifidobacterium</i>	<i>infantis</i>	ATCC 15697	51,4
<i>Bifidobacterium</i>	<i>breve</i>	BBC50 = I-2219	58,6
<i>Lactobacillus</i>	<i>casei</i>	Shirota	67,6
<i>Bifidobacterium</i>	<i>breve</i>	ATCC 15700	68,5
<i>Bifidobacterium</i>	<i>longum</i>	NCC2705 = CNCM I-2618	72,6
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	HN001 = NM97/09514	92,1
<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	CRL431=ATCC55544	164,0

- 10 Ces résultats montrent que la souche CNCM I-3689 présente d'importantes propriétés anti-inflammatoires sur ce modèle. Aucune des souches de référence testées ne présente d'aussi bonnes propriétés.

- 15 La Figure 1 représente le ratio IL-10/IL-12 de chaque souche bactérienne en fonction de son score anti-pathogène (unité arbitraire) déterminés ci-dessus. Cette Figure montre à quel point la souche CNCM I-3689 se différencie par rapport aux autres souches testées.

3- Survie au stress intestinal

Un modèle *in vitro* reflétant les conditions de stress intestinal a été utilisé.

Des cultures de bactéries lactiques sont réalisées dans du lait supplémenté avec de l'extrait de levure. Les cultures sont incubées pendant 24 à 48h, selon les espèces (jusqu'à la phase stationnaire de culture).

Un jus intestinal artificiel composé de sels biliaires de porc (à 3.3 g/l) et de tampon carbonate NaHCO_3 (à 16,5 g/l) est réalisé. Le pH est ajusté à 6,3. 1 ml de ce jus intestinal est ajouté à 100 μl de culture bactérienne. Les cultures sont ensuite incubées 5 heures. Ensuite, les populations bactériennes avant et après le stress sont évaluées sur boîtes.

Les valeurs sont exprimées de la manière suivante :
 $\text{Stress intestinal} = \log (\text{ufc5h}/\text{ufc0h})$.

ufcXmin étant la concentration en bactéries exprimée en Unités Formant Colonies (UFC) après X minutes d'incubation.

Pour le stress intestinal, la survie est bonne quand la valeur est supérieure à -0,5, moyennement bonne quand la valeur est comprise entre -0,5 et -1,5 et mauvaise quand la valeur est inférieure à -1,5.

Les résultats sont donnés dans le Tableau IV suivant.

Tableau IV

Genre	Espèce	Référence	Stress intestinal
<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	DN 114121 = CNCM I-3689	-0,40
<i>Bifidobacterium</i>	<i>animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	HN019 = NM97/01925	3,40
<i>Bifidobacterium</i>	<i>infantis</i>	ATCC 15697	2,79
<i>Lactobacillus</i>	<i>reuteri</i>	Biogaia SD 2112 ATCC55730	1,00
<i>Lactobacillus</i>	<i>johnsonii</i>	NCC533=La1=I-1225	0,69
<i>Bifidobacterium</i>	<i>animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	BB12 = ATCC 27536	0,07
<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>	CRL431=ATCC55544	0,04
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	HN001 = NM97/09514	0,00
<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>	LGG = ATCC 53103	-0,07
<i>Bifidobacterium</i>	<i>breve</i>	ATCC 15700	-0,14
<i>Bifidobacterium</i>	<i>longum</i>	NCC2705 = CNCM I-2618	-0,22
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	La-5	-0,23
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	ATCC 14917= DSMZ 20174=WCFS1	-0,79
<i>Bifidobacterium</i>	<i>breve</i>	BBC50 = I-2219	-0,91
<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	Probi 299v = DSM 9843	-1,04
<i>Bifidobacterium</i>	<i>longum</i>	BB536	-1,12
<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>	NCFM	-1,45
<i>Lactobacillus</i>	<i>casei</i>	Shirota	-1,50
<i>Lactobacillus</i>	<i>reuteri</i>	DSMZ 20016	-1,91

4- Conclusion

Les résultats illustrés dans les Tableaux II, III et IV ci-dessus montrent que, parmi les différentes souches testées, la souche CNCM I-3689 est la seule à présenter à la fois des propriétés anti-microbiennes et des propriétés anti-inflammatoires importantes, accompagnées en outre de bonnes propriétés de résistance au stress intestinal.

EXEMPLE 2 : CROISSANCE SUR LAIT DE LA SOUCHE CNCM I-3689

Les propriétés de croissance sur lait de la souche CNCM I-3689 ont été testées en utilisant le protocole suivant :

- Un milieu constitué de lait écrémé reconstitué par de l'eau additionnée de poudre de lait écrémé a été ensemencé avec la souche CNCM I-3689 ($5,6 \times 10^6$ ufc/g ou $1,1 \times 10^7$ ufc/g).

- L'activité fermentaire de cette souche, reliée à sa croissance, est mesurée en suivant en continu le pH du milieu de croissance.

Les résultats sont illustrés par le graphique
5 présenté à la Figure 2.

Ces résultats montrent que la souche CNCM I-3689 est capable de croître efficacement sur du lait, et qu'elle peut donc être utilisée dans la fabrication de produits laitiers fermentés.

0 **EXEMPLE 3 : TYPAGE MOLECULAIRE DE LA SOUCHE CNCM I-3689**

De nombreux organismes procaryotes possèdent un ou plusieurs loci CRISPR - acronyme pour « *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* » (Jansen et al., 2002, OMICS, Vol 6, Nb 1, 23-33). Un locus CRISPR est caractérisé
5 par des séquences répétées (ou DR) non-contiguës, généralement de 21 à 37 paires de bases (pb), séparées par des séquences uniques, généralement de 20 à 40 paires de bases appelées séquences variables (« *spacers* »). D'une souche bactérienne à l'autre, il est possible d'observer des différences sur :

- 10 - le nombre de loci CRISPRs,
- la position des loci CRISPRs dans le génome,
- le nombre de séquences répétées, et/ou
- la nature et/ou la taille des séquences variables.

1- Identification du locus CRISPR de la souche CNCM I-3689

15 La souche CNCM I-3689 a été séquencée. L'analyse de son génome à l'aide de la suite de logiciels ERGO™ a permis d'identifier un seul locus CRISPR dans cette souche. Ce locus, d'une taille de 3323 pbs, se situe à 20 paires de bases en aval de l'ORF RDBK00370. Sa séquence d'ADN génomique est
20 représentée par la séquence SEQ ID NO : 1. Il est composé d'une unité répétitive (GTTTCCCCGCACATGCGGGGTGATCC ; SEQ ID NO : 2) qui est identique à celle du locus CRISPR de la souche ATCC 334 (*Lactobacillus casei*), et de 54 séquences variables (*spacers*).

25 2- Construction d'amorces pour amplification PCR, spécifiques de la souche CNCM I-3689

Plusieurs couples d'amorces oligonucléotidiques ont été définis à partir des séquences variables du locus CRISPR

de la souche CNCM I-3689. Ces amorces ont été testées par amplification PCR sur plusieurs souches bactériennes afin de vérifier leur spécificité pour la souche CNCM I-3689.

Un couple d'amorces a été retenu :

- 5 - amorce OFF2486 (CTCAACAGGATAAGTGCCAC ; SEQ ID NO : 3), située dans la 33ème séquence variable du locus CRISPR, aux positions 2049-2068 ; TM = 60°C ;
- amorce OFF2488 (GGTTGGCTGGGTTTAACGC ; SEQ ID NO : 4), située dans la 37ème séquence variable du locus CRISPR,
- 10 aux positions 2093-2110 ; TM = 60°C.

Les conditions de PCR retenues sont les suivantes :

Mélange réactionnel :

ADN :	1 µl
dNTPs:	4 µl
Tampon 10X:	5 µl
Amorce OFF2486 :	0,3 µl
Amorce OFF2488 :	0,3 µl
ADN polymérase Ex taq TM :	0,2 µl
Eau :	39,2 µl

Cycles :

95°C	5'	} x 30
95°C	30''	
61°C	30''	
72°C	45''	
72°C	10'	
10°C		

- 15 La taille attendue du produit de PCR à partir de la souche CNCM I-3689 est de 263 pbs.

- Le couple d'amorces OFF2486/OFF2488 a été testé sur la souche CNCM I-3689 et sur 18 autres souches de *Lactobacillus casei* différentes, dont les souches CNCM I-1518 et ATCC 334. Les souches CNCM I-1518 et ATCC 334
- 20 représentaient les témoins négatifs car lesdites amorces ne peuvent pas s'hybrider à la séquence d'ADN génomique de ces souches dans les conditions de PCR décrites ci-dessus.

- Les résultats sont illustrés par l'électrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification PCR, présentée
- 25 à la Figure 3, où « 121 » représente la souche CNCM I-3689,

« 001 » représente la souche CNCM I-1518, « S3 » à « S18 » représentent respectivement 16 souches différentes de *Lactobacillus casei* et « SL » représente un marqueur de poids moléculaire (SmartLadder ; Eurogentec).

5 Ces résultats montrent que le couple d'amorces OFF2486/OFF2488 est bien spécifique de la souche CNCM I-3689, dans la mesure où il a été obtenu des produits d'amplification PCR de taille attendue (c'est-à-dire environ 260 pbs) uniquement pour cette souche.

10

REVENDICATIONS

1) Souche de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* possédant des propriétés anti-microbiennes et immunomodulatrices, caractérisée en ce qu'il s'agit de la souche déposée auprès de la CNCM sous le numéro I-3689.

2) Souche de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* possédant des propriétés anti-microbiennes et immunomodulatrices, caractérisée en ce qu'elle est susceptible d'être obtenue à partir d'une souche selon la revendication 1 par mutagenèse ou transformation génétique.

3) Procédé d'obtention d'une souche de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* possédant des propriétés anti-microbiennes et/ou immunomodulatrices, caractérisée en ce qu'il comprend une étape de mutagenèse ou de transformation génétique de la souche CNCM I-3689.

4) Procédé d'obtention d'une fraction cellulaire possédant des propriétés anti-microbiennes et/ou immunomodulatrices, caractérisée en ce que ladite fraction cellulaire est obtenue à partir d'une souche de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2.

5) Composition comprenant une souche de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* selon la revendication 1, ou une fraction cellulaire obtenue selon le procédé défini à la revendication 4.

6) Composition selon la revendication 4, caractérisée en ce qu'il s'agit d'un produit alimentaire.

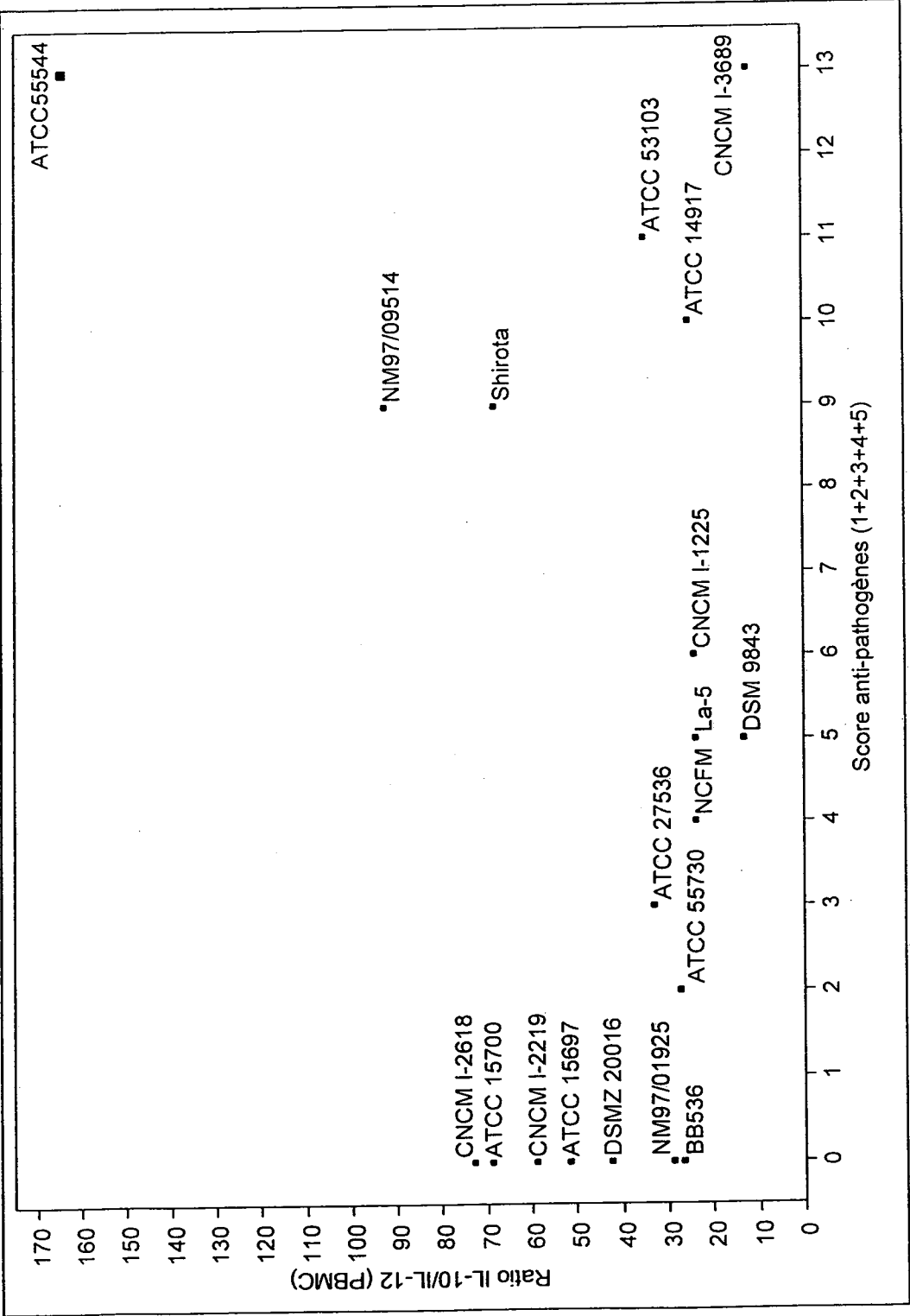


Figure 1

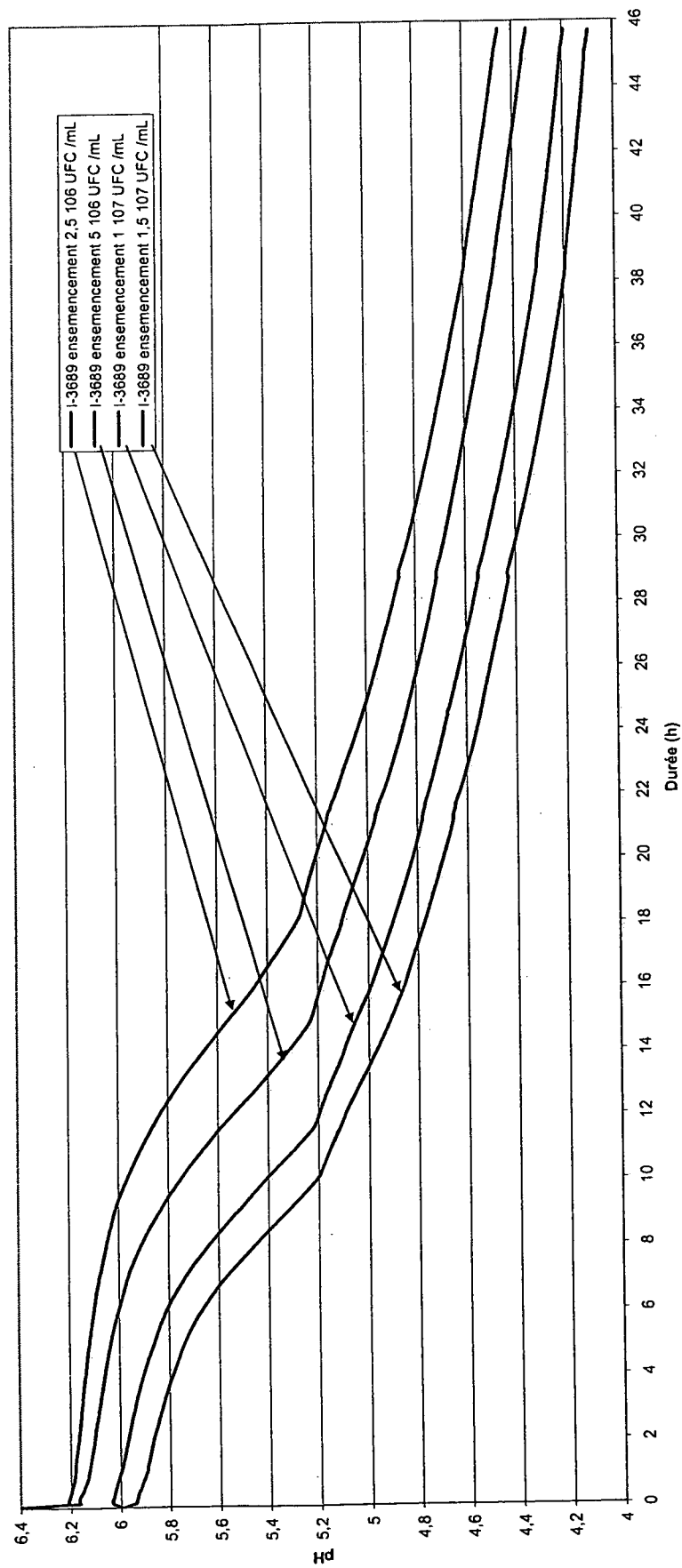


Figure 2

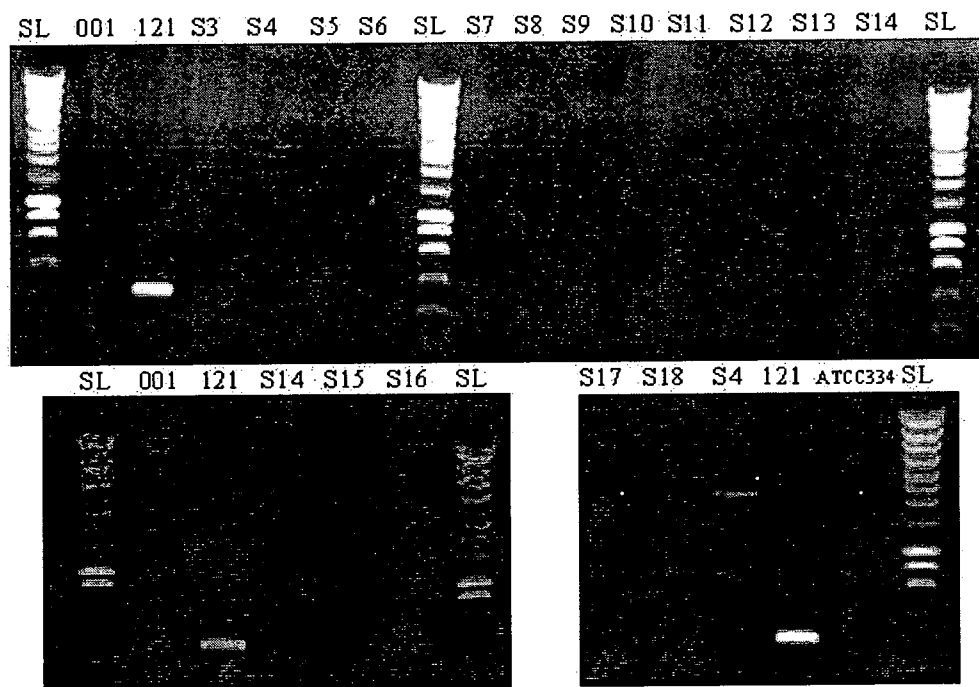


Figure 3