



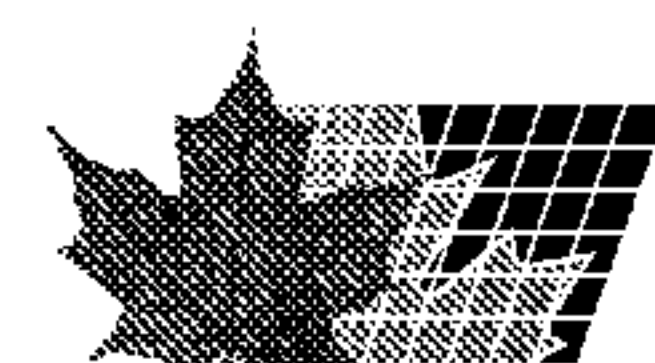
(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2001/07/04
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2002/01/10
(45) Date de délivrance/Issue Date: 2012/10/16
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2003/01/03
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 2001/002147
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2002/002800
(30) Priorité/Priority: 2000/07/04 (FR00/08672)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *C12Q 1/02* (2006.01)
(72) Inventeurs/Inventors:
ANTOINE, JEAN-MICHEL, FR;
FREITAS, MIGUEL, FR;
CAYUELA, CHANTAL, FR;
TRUGNAN, GERMAIN, FR
(73) Propriétaire/Owner:
COMPAGNIE GERVAIS DANONE, FR
(74) Agent: GOUDREAU GAGE DUBUC

(54) Titre : MICROORGANISMES AYANT UNE ACTION MODULATRICE DE LA GLYCOSYLATION DE SURFACE DES
CELLULES INTESTINALES
(54) Title: MICRO-ORGANISMS WITH GLYCOSYLATION MODULATING ACTION OF INTESTINAL CELL SURFACE

(57) **Abrégé/Abstract:**

L'invention a pour objet les souches de microorganismes, en particulier de bactéries lactiques, ayant un effet modulateur de bactéries lactiques, ayant un effet modulateur de la glycosylation de surface des cellules intestinales. L'invention a également pour objet une méthode de sélection des souches de microorganismes, en particulier de bactéries lactiques, dans laquelle est mesurée la variation de l'intensité de fluorescence moyenne de cellules HT29-MTX incubées en présence d'une lectine couplée à un fluorochrome après avoir été en contact avec le surnageant de chaque souche étudiée. Ces souches de bactéries lactiques peuvent être utilisées, éventuellement sous forme de leur fraction active, pour la préparation de compositions alimentaires ou médicaments ou compléments alimentaires, modulant la glycosylation des glycoprotéines des cellules épithéliales intestinales.



(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
10 janvier 2002 (10.01.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/02800 A1(51) Classification internationale des brevets⁷ : C12Q 1/02,
C12R 1/225(74) Mandataires : VERCAEMER, Laurence etc.; Cabinet
Plasseraud, 84, rue d'Amsterdam, F-75440 Paris Cedex 9
(FR).(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR01/02147(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) Date de dépôt international : 4 juillet 2001 (04.07.2001)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
00/08672 4 juillet 2000 (04.07.2000) FR(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : AN-
TOINE, Jean-Michel [FR/FR]; 10, Rue Fernet, F-94700
Maisons-alfort (FR). FREITAS, Miguel [FR/FR]; 94, rue
du Temple, F-75003 Paris (FR). CAYUELA, Chantal
[FR/FR]; 20, rue Spontini, F-75016 Paris (FR). TRUG-
NAN, Germain [FR/FR]; 96, avenue Pasteur, F-93100
Montreuil (FR).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abrégiactions" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.*

(54) Title: MICRO-ORGANISMS WITH GLYCOSYLATION MODULATING ACTION OF INTESTINAL CELL SURFACE

(54) Titre : MICROORGANISMES AYANT UNE ACTION MODULATRICE DE LA GLYCOSYLATION DE SURFACE DES
CELLULES INTESTINALES

(57) Abstract: The invention concerns micro-organism strains, in particular of lactic acid bacteria, having a glycosylation modulating effect of intestinal cell surface. The invention also concerns a method for selecting micro-organism strains, in particular of lactic acid bacteria, which consists in measuring the average fluorescence intensity variation of HT29-MTX cells incubated in the presence of a lectin coupled with a fluorochrome after being in contact with the supernatant of the strain concerned. Said lactic acid bacteria strains can be used, optionally in the form of their active fraction, for preparing food compositions or medicines or food supplements, modulating glycosylation of glycoproteins of intestinal epithelial cells.

(57) Abrégé : L'invention a pour objet les souches de microorganismes, en particulier de bactéries lactiques, ayant un effet modulateur de bactéries lactiques, ayant un effet modulateur de la glycosylation de surface des cellules intestinales. L'invention a également pour objet une méthode de sélection des souches de microorganismes, en particulier de bactéries lactiques, dans laquelle est mesurée la variation de l'intensité de fluorescence moyenne de cellules HT29-MTX incubées en présence d'une lectine couplée à un fluorochrome après avoir été en contact avec le surnageant de chaque souche étudiée. Ces souches de bactéries lactiques peuvent être utilisées, éventuellement sous forme de leur fraction active, pour la préparation de compositions alimentaires ou médicaments ou compléments alimentaires, modulant la glycosylation des glycoprotéines des cellules épithéliales intestinales.



WO 02/02800 A1

MICROORGANISMES AYANT UNE ACTION MODULATRICE DE LA GLYCOSYLATION DE SURFACE
DES CELLULES INTESTINALES

5 L'invention a pour objet les microorganismes ayant
un effet modulateur de la glycosylation de surface ou de
la composition en sucres à la surface des cellules
intestinales, ainsi qu'une méthode de sélection desdits
microorganismes, et leurs utilisations dans les domaines
10 alimentaire et médical.

La muqueuse gastro-intestinale consiste en une
couche simple de cellules épithéliales recouverte au moins
partiellement du côté de la lumière intestinale d'une
couche visco-élastique constituée principalement de
15 glycoconjugués. Les cellules épithéliales synthétisent les
glycoconjugués présents à leur surface, qui sont les
intermédiaires de nombreuses interactions, en particulier
avec des lectines ou adhésines, avec des toxines
bactériennes, ou avec des anticorps, des bactéries, des
20 virus, des parasites. Ces glycoconjugués constituent donc
des intermédiaires importants dans les relations entre
l'hôte et la flore intestinale.

Ces glycoconjugués sont, comme leur nom l'indique,
des composés glycosylés, c'est-à-dire sur lesquels sont
25 greffées des chaînes de sucres plus ou moins longues et
éventuellement ramifiées. Dans l'intestin humain sain, ces
sucres peuvent être le galactose (Gal), le fucose (Fuc),
l'acide N-acétylneuraminique ou acide sialique, la N-
acétylglucosamine (GlcNAc), la N-acétylgalactosamine
30 (GalNAc), reliés entre eux par différentes liaisons. Trois
d'entre eux peuvent être en position terminale ; il s'agit
du galactose, du fucose et de l'acide sialique.

Un hôte et sa microflore intestinale fonctionnent
comme un système complexe dans lequel la microflore a un

impact significatif sur l'hôte. Dans le cas de microorganismes non-pathogènes ou probiotiques, on se trouve souvent en présence d'une relation symbiotique ou de coopération entre l'hôte et les microorganismes, la présence de ces derniers étant nécessaire au bon équilibre et au bon fonctionnement de l'intestin de l'hôte. Au contraire, la présence de microorganismes pathogènes, plus rare, peut avoir des conséquences négatives, en empêchant ou diminuant la présence des microorganismes probiotiques, voire même en ayant une action de parasitisme directement néfaste pour l'hôte.

L'équilibre fragile entre l'hôte et la microflore est directement lié à l'environnement intestinal et en particulier à la présence quantitative et qualitative des glycoconjugués de surface. En effet, on sait que certains microorganismes, probiotiques ou pathogènes, seront sensibles à certains sucres en position terminale. Les bactéries intestinales peuvent moduler le schéma de glycosylation des glycoconjugués présents à la surface des cellules intestinales, sans que leur mode d'action soit complètement éclairci comme on le verra ci-après. Les bactéries peuvent, d'une part, induire la présence de tel ou tel sucre lors de la glycosylation et, d'autre part, dégrader les sucres présents en position terminale d'une chaîne, ce qui modifie qualitativement et/ou quantitativement les sucres présents en position terminale.

Cette modulation du schéma de glycosylation de surface des cellules épithéliales entraîne une modification de l'environnement intestinal, l'environnement modifié pouvant favoriser l'implantation de certains microorganismes et/ou limiter, voire éviter, l'implantation d'autres microorganismes. Une modification de l'environnement, éventuellement généré par la

microflore, a donc un impact direct sur l'équilibre entre l'hôte et la microflore.

Il serait donc très intéressant de disposer d'un modèle permettant de sélectionner rapidement et facilement
5 des microorganismes en fonction de leur action sur le schéma de glycosylation. On pourrait ainsi identifier des microorganismes favorisant la présence de tel ou tel sucre, et donc favorisant l'implantation de microorganismes bénéfiques comme par exemple des
10 probiotiques et/ou limitant l'implantation de microorganismes pathogènes.

En effet, d'après les connaissances de la Demanderesse, on n'a pas à ce jour identifié de microorganismes, en particulier de bactéries lactiques,
15 capables d'agir finement, avec précision, sur le schéma de glycosylation, et ainsi de moduler avec précision ce schéma de glycosylation et donc l'implantation de microorganismes.

De tels microorganismes modulateurs du schéma de glycosylation pourraient trouver une utilisation en
20 particulier dans des compositions pharmaceutiques ou alimentaires ou compléments alimentaires. En effet, ils peuvent permettre d'optimiser le fonctionnement des cellules intestinales et le bon équilibre de la
25 microflore.

Le document WO 99/29833 décrit une nouvelle souche de bactérie présentant certaines propriétés, par exemple activité anti-microbienne. Cependant, les modalités de son action ne sont pas détaillées, et en particulier la
30 question de l'éventuelle action de la bactérie sur les sucres n'est jamais abordée.

Bry L. et al., dans « A model of host-microbial interactions in an open mammalian ecosystem », Science, Vol. 273, pp. 1380-1383, Sept. 6, 1996, ont étudié in vivo

(chez la souris) l'influence de *Bacteroides thetaiotaomicron* sur la fucosylation. *Bacteroides thetaiotaomicron* fait partie de la flore intestinale chez l'homme et chez la souris. Le modèle utilisé est cependant
5 limité à l'étude de la fucosylation, à l'exclusion des autres types de glycosylation. C'est d'autre part un modèle in vivo, donc plus long et complexe à mettre en œuvre qu'un modèle in vitro.

Toutefois, ce modèle a permis d'émettre
10 l'hypothèse de l'existence d'un facteur soluble sécrété par *B. thetaiotaomicron*, et qui jouerait le rôle d'un signal entraînant la modification de la glycosylation de surface. Ce facteur soluble, non identifié, agirait donc sans qu'il y ait contact direct entre les bactéries et les
15 cellules cibles.

A la connaissance de la Société Demanderesse, aucune méthode n'a été développée à ce jour permettant de sélectionner in vitro, de manière facile et rapide, différents microorganismes, en particulier différentes
20 souches de bactéries lactiques, en fonction de leur action précise sur le schéma de glycosylation des cellules épithéliales intestinales, et plus précisément sur la modulation ou variation de la composition en chacun des sucres.

25 Dans le cadre de la présente demande, le terme « bactéries lactiques » désigne les bactéries susceptibles de produire de l'acide lactique, et notamment les bactéries non pathogènes choisis dans le groupe comprenant *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*
30 et *Leuconostoc*, en particulier *B. breve*, *B. longum*, *L. lactis*, *S. thermophilus*, *L. casei*, *L. helveticus* et *L. bulgaricus*.

Un objet de la présente invention est donc une telle méthode de sélection in vitro, qui comprend les étapes suivantes :

- 5 - mise en contact du surnageant de culture de la souche de microorganismes, en particulier de bactéries lactiques, avec des cellules d'un modèle de lignée cellulaire représentant les cellules épithéliales intestinales,
- incubation,
- 10 - extraction des cellules et incubation avec différentes lectines couplées à un fluorochrome,
- lavage,
- 15 - mesure de l'intensité de fluorescence moyenne (IFM) de chaque lectine, comparaison avec les mesures effectuées sur un échantillon témoin pour évaluer la variation d'IFM induite par les bactéries, sélection de la souche de microorganismes induisant une variation d'au
- 20 moins 20% pour au moins un sucre.

Cette dernière étape peut notamment être réalisée sur plaques, la mesure de l'IFM étant mesurée par sonde, selon des techniques connues de l'homme du métier, ou par cytométrie de flux. Dans le cas de la cytométrie de flux,

25 on peut aussi effectuer la comparaison du graphe obtenu, représentant l'évolution de la fluorescence en fonction du nombre de cellules avec celui obtenu avec un échantillon témoin, et sélectionner la souche de microorganismes induisant une variation de l'allure du graphe.

30 On utilise dans cette méthode de sélection un modèle quelconque de lignée cellulaire représentant les cellules épithéliales intestinales. L'homme de l'art saura choisir un modèle de lignée approprié parmi les modèles connus, par exemple les lignées Caco-2 ou HT29-MTX, qui

sont des cellules épithéliales intestinales cancéreuses en culture. Ces lignées sont considérées comme reproduisant tout ou partie des mécanismes de régulation des systèmes in vivo et en particulier la production de glycoconjugués.

5 Toute lignée présentant cette caractéristique peut être utilisée dans la méthode selon l'invention. Concernant la lignée HT29-MTX, on pourra se référer à Lesuffleur et al., « *Growth adaptation to methotrexate of HT-29 human colon carcinoma cells is associated with their ability to*

10 *differentiate into columnar absorptive and mucus-secreting cells* », 1990, Cancer Res., 50:6334-6343.

On effectue une centrifugation et une filtration du milieu de culture dans lequel a été incubée chaque souche de microorganismes à tester, afin d'en extraire le surnageant (« essai »).

15 Sans vouloir être liée par une quelconque théorie, la Demanderesse estime que le surnageant contient le facteur soluble constituant le signal de modulation de la glycosylation. Le surnageant constitue donc une fraction active de souche de microorganismes.

20 Mis en contact avec les cellules épithéliales intestinales, il va entraîner ou non telle ou telle modification de la glycosylation en fonction de la souche de microorganismes testée.

Ainsi chez *Bacteroides*, le facteur soluble a été identifié comme étant une molécule de faible poids moléculaire (inférieur à 8 kD) et qu'il est sensible à la chaleur. On peut supposer que le facteur soluble d'une autre souche présentera des caractéristiques similaires sinon identiques.

25

30 Le surnageant obtenu à partir du milieu de culture qui n'a pas été en contact avec les bactéries est utilisé comme contrôle (« témoin »).

On incorpore une quantité appropriée des surnageants « essai » et « témoin » au milieu de culture

dans lequel sont placées les cellules du modèle de lignée cellulaire, par exemple HT29-MTX, pendant une période appropriée. Cette période peut être, par exemple, de 1 à 15 jours.

5 Dans un mode de réalisation particulier, on peut ajouter, à la place du surnageant, des bactéries. Dans ce cas, on pourra ajouter les bactéries sous forme de suspension en présence de pénicilline G et d'un tampon fort permettant d'inhiber le développement bactérien sans
10 empêcher la viabilité des bactéries, et acidification du milieu.

Après cette période d'incubation, les cellules du modèle de lignée cellulaire sont détachées et resuspendues, et le même nombre de cellules « essai » et
15 « témoin » est incubé séparément avec une lectine dont on connaît la spécificité vis à vis des sucres (nature du sucre, nature de la liaison).

Chaque lectine, qui est couplée à un fluorochrome, va se fixer sur le sucre dont elle est spécifique.

20 Les suspensions cellulaires « essai » et « témoin » sont chacune lavées plusieurs fois, et la réactivité de chaque lectine est quantifiée par mesure de la fluorescence appelée IFM (intensité de fluorescence moyenne).

25 Cette mesure peut être effectuée par tout moyen approprié, en particulier au moyen de la cytométrie de flux (FACScan , Bencton-Dickinson) ou par mesures fluorimétriques directes sur plaques.

Lorsqu'on utilise la cytométrie de flux, on
30 obtient pour chaque lectine un graphe représentant l'évolution de la fluorescence en fonction du nombre de cellules. Pour chaque graphe de cytométrie de flux, l'intensité de fluorescence moyenne correspond à la valeur médiane.

Deux comparaisons sont possibles. D'une part, quel que soit le moyen de mesure de l'intensité de fluorescence, on peut comparer quantitativement l'IFM « essai » avec l'IFM « témoin ». D'une part, dans le cas
5 de la cytométrie de flux, on peut également comparer qualitativement le résultat « essai » avec le résultat « témoin », et plus précisément comparer le graphe obtenu avec la suspension « essai » avec celui obtenu avec la suspension « témoin », c'est-à-dire comparer l'allure des
10 courbes.

On estime qu'une diminution ou une augmentation de cette IFM d'au moins environ 20%, de préférence au moins environ 28%, plus préférentiellement encore d'au moins environ 35%, révèle un changement significatif de la
15 réactivité de chaque lectine, donc de la composition en sucres des glycoprotéines présentes à la surface des cellules épithéliales.

Cette méthode permet donc d'observer et de quantifier de manière simple et rapide la présence de
20 chaque lectine sur les chaînes de sucre, donc de quantifier le sucre dont la lectine est spécifique. On peut alors comparer les valeurs obtenues sans et avec microorganismes, et ainsi évaluer les effets modulateurs de la glycosylation de chaque souche de microorganismes,
25 afin de sélectionner les souches ayant l'effet souhaité : augmentation de tel sucre, diminution de tel autre.

L'invention a également pour objet les souches de microorganismes, en particulier de bactéries lactiques, susceptibles de moduler le schéma de glycosylation de
30 surface des cellules épithéliales intestinales, et plus particulièrement les souches de microorganismes, en particulier de bactéries lactiques, susceptibles d'être sélectionnées par la méthode décrite ci-dessus.

De tels microorganismes permettent donc de moduler
35 la glycosylation, et donc de rétablir ou modifier

l'environnement intestinal afin de favoriser l'implantation de microorganismes probiotiques et d'éviter ou limiter l'implantation de microorganismes pathogènes.

On sait par exemple que le récepteur permettant
5 l'adhésion d' *Escherichia coli* contient du galactose et de l'acide sialique ; pour *Streptococcus pyogenes* et *Listeria monocytogenes*, il s'agit du galactose ; pour *Helicobacter pylori*, il s'agit du fucose ; et pour *Entamoeba histolytica*, il s'agit du galactose et de la N-acétyl
10 galactosamine.

Les souches objet de l'invention peuvent être en particulier les souches suivantes : N° de collection CNCM I-2492, N° de collection CNCM I-2493, N° de collection CNCM I-2494 (CNCM = Collection Nationale de Cultures de
15 Micro-organismes - Institut Pasteur - 28, rue du Dr. Roux - 75724 Paris Cedex 15 - France), déposées le 20 juin 2000.

On peut utiliser de tels microorganismes, en particulier de telles bactéries lactiques, ou leur
20 fraction active c'est-à-dire la fraction comprenant le facteur soluble, pour la préparation de compositions alimentaires ou de médicaments ou compléments alimentaires modulant la glycosylation de surface des cellules épithéliales intestinales. Ces compositions peuvent
25 comprendre une souche unique, ou plusieurs souches, de microorganismes modulant la glycosylation.

Ainsi, on dispose de compositions permettant de maintenir ou rétablir un équilibre correct hôte - microflore intestinale, ou permettant de favoriser
30 l'implantation de telle ou telle souche de microorganismes. Elles permettent donc d'optimiser le fonctionnement des cellules intestinales et le bon équilibre de la microflore. On peut en particulier

utiliser des bactéries lactiques, et les incorporer à des produits laitiers.

Les souches testées dans les essais ci-après sont données à titre d'exemples non limitatifs.

5 ESSAIS IN VITRO BACTERIES LACTIQUES

On effectue une centrifugation et une filtration du milieu de culture dans lequel ont été incubées pendant une nuit des bactéries lactiques (LAB = Lactic Acid Bacteria), afin d'en extraire le surnageant (« essai »).

10 Les souches de LAB utilisées sont les suivantes :
N° de collection CNCM I-2492, N° de collection CNCM I-2493, N° de collection CNCM I-2494.

Le surnageant obtenu à partir du milieu de culture qui n'a pas été en contact avec les bactéries est utilisé
15 comme contrôle (« témoin »).

On incorpore une quantité optimale pour chaque surnageant (entre 10% et 30%) « essai » et « témoin » au milieu de culture DMEM (« Dulbecco's Modified Eagle's Medium ») dans lequel est placée la lignée cellulaire
20 HT29-MTX pendant 5 à 15 jours.

Après ce traitement, les cellules HT29-MTX sont détachées et resuspendues dans une solution PBS (« Phosphate Buffered Saline Solution »), et le même nombre de cellules « essai » et « témoin » est incubé
25 séparément avec une lectine spécifique d'un sucre (nature du sucre, nature de la liaison) à concentration optimum pendant 30 minutes.

Les lectines commerciales utilisées et leur(s) épitope(s) sont les suivants :

30	Lectine	Lectine	Epitope(s)
	Nom	Abréviation	
	<i>Artocarpus integrifolia</i>	Jak	Gal
	<i>Ricinus communis</i>	RCA I	Gal
	<i>Griffonia simplicifolia</i> I B4	GSI-B4	Gal α 3Gal

	<i>Helix pomatia</i>	HPA	GalNAc
	<i>Datura stramonium</i>	DSA	GlcNAc
	<i>Wheat germ</i>	WGA	GlcNAc et acide sialique
5	<i>Anguilla anguilla</i>	AAA	α -L-Fucose
	<i>Ulex europaeus I</i>	UEA I	Fuc α 2Gal β
	<i>Maackia amurensis</i>	MAA	ac. sialique α 2,3
	<i>Sambucus nigra</i>	SNA	ac. sialique α 2,6

10 Toutes ces lectines sont commercialisées par EY Laboratories Inc. (San Mateo, CA, USA) sauf RCA I, commercialisée par Sigma Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France).

15 On obtient par cytométrie de flux, pour chaque souche de bactéries lactiques acides, et pour les cellules « témoin » et « essai », les valeurs d'intensité de fluorescence moyenne suivantes :

	CNCM I-2492			
20	Lectine	"témoin"	"essai"	Evolution
	RCA	424	392	- 7.5%
	Jak	422	431	+ 2%
	DSA	237	241	+ 1.6%
	SNA	57	48	- 16%
25	HPA	334	350	+ 4.5%

	CNCM I-2493			
	Lectine	"témoin"	"essai"	Evolution
	Jak	535	392	- 26.7%
30	SNA	48	36	- 25%
	HPA	354	379	+ 7%
	MAA	665	518	- 22%
	WGA	1313	1376	+ 4.8%
	GSI	37	31	- 16%
35	RCA	317	247	- 22%
	DSA	176	165	- 6%

	CNCM I-2494			
	Lectine	"témoin"	"essai"	Evolution
	Jak	346	446	+ 29%
	SNA	34	35	+ 2.9%
5	HPA	748	593	- 20.7%
	AAA	10	20	+ 100%
	MAA	668	644	- 3.6%
	WGA	302	290	- 4%
	GSI	30	32	+ 6.7%
10	RCA	258	369	+ 43%
	DSA	176	198	+ 11%

Ainsi, on peut immédiatement constater l'action
modulatrice de la glycosylation de chaque souche de
15 bactéries. Par exemple, on peut constater que la souche
CNCM I-2494 entraîne une augmentation de Gal et de α -L-
Fucose, et une diminution de GalNAc.

REVENDICATIONS

1. Méthode de sélection de souches de microorganismes comprenant les étapes suivantes :

- mise en contact du surnageant de culture de la souche de microorganismes, avec des cellules d'un modèle de lignée cellulaire représentant les cellules épithéliales intestinales,
- incubation,
- extraction des cellules et incubation avec différentes lectines couplées à un fluorochrome,
- lavage, et
- mesure de l'intensité de fluorescence moyenne (IFM) de chaque lectine, comparaison avec les mesures effectuées sur un échantillon témoin pour évaluer la variation d'IFM induite, et sélection de la souche de microorganismes induisant une variation d'au moins environ 20%, pour au moins un sucre.

2. Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'intensité de fluorescence moyenne est mesurée par cytométrie de flux, et correspond à la valeur médiane du graphe obtenu représentant l'évolution de la fluorescence en fonction du nombre de cellules.

3. Méthode selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que les microorganismes sont des bactéries.

4. Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que la souche de microorganismes sélectionnée induit une variation d'IFM d'au

moins environ 28%.

5. Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que les cellules du modèle de lignée cellulaire sont des cellules HT29-MTX.

6. Souche de bactéries lactiques déposée sous le numéro CNCM I-2493.

7. Souche de bactéries lactiques déposée sous le numéro CNCM I-2494.

8. Utilisation d'une souche de bactéries telle que définie dans la revendication 6 ou 7, ou de la fraction active d'une telle souche, pour la préparation d'une composition alimentaire ou pharmaceutique ou complément alimentaire modulant la glycosylation de surface des cellules épithéliales intestinales.

9. Composition alimentaire ou pharmaceutique, caractérisée par le fait qu'elle comprend au moins une souche de bactéries telle que définie dans la revendication 6 ou 7 ou au moins une fraction active d'une de ces souches et comprend au moins un excipient pharmaceutiquement acceptable.

10. Méthode selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que les microorganismes sont des bactéries lactiques.

11. Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que la souche de

microorganismes sélectionnée induit une variation d'IFM d'au moins environ 35%.