

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
COURBEVOIE

①1 N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

3 134 581

②1 N° d'enregistrement national : **22 03569**

⑤1 Int Cl⁸ : **C 12 N 1/18 (2022.01), A 23 K 10/18, 50/42**

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

⑫② Date de dépôt : 15.04.22.

⑫③ Priorité :

⑫④ Date de mise à la disposition du public de la demande : 20.10.23 Bulletin 23/42.

⑫⑤ Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du présent fascicule*

⑫⑥ Références à d'autres documents nationaux apparentés :

Demande(s) d'extension :

⑦① Demandeur(s) : **LESAFFRE ET COMPAGNIE** Société à responsabilité limitée — FR.

⑦② Inventeur(s) : **ADIB LESAUX** Achraf, **SAMPSONIS** Cécile et **RABOT** Rodolphe.

⑦③ Titulaire(s) : **LESAFFRE ET COMPAGNIE** Société à responsabilité limitée.

⑦④ Mandataire(s) : **Plasseraud** IP.

⑫④ Levure *Saccharomyces cerevisiae* et son utilisation pour améliorer la santé intestinale des animaux de compagnie.

⑫⑤ La présente invention a pour objet une levure *Saccharomyces cerevisiae* obtenue par culture de la souche *Saccharomyces cerevisiae* déposée le 03 mars 2021 auprès de la CNCM sous le numéro I-5660, qui est une levure sèche active présentant les caractéristiques physico-chimiques suivantes :- une teneur en matières sèches supérieure à 95% en poids et pouvant aller jusqu'à 97% en poids ; - une activité de l'eau allant de 0,1 à 0,3 ; - une forme de sphérule ; - une granulométrie caractérisée par une courbe gaussienne de distribution de la taille montrant qu'au moins 90% des sphérules présentent un diamètre allant de 0,3 à 0,7mm. L'invention concerne également l'utilisation de ladite levure pour améliorer la santé intestinale des animaux de compagnie. La présente invention a encore pour objet un facteur d'appétence solide pour animaux de compagnie ou un aliment pour animaux de compagnie, caractérisé en ce qu'il comprend une levure telle que ci-dessus définie, ladite levure présentant une durée de vie allant de 12 à 24 mois au sein dudit facteur d'appétence ou dudit aliment.

FR 3 134 581 - A1



Description

Titre de l'invention : Levure *Saccharomyces cerevisiae* et son utilisation pour améliorer la santé intestinale des animaux de compagnie.

Domaine technique

[0001] La présente demande relève du domaine de la nutrition animale et de la santé intestinale des animaux de compagnie. Elle concerne notamment une levure *Saccharomyces cerevisiae* pour son utilisation dans l'amélioration de la santé intestinale des animaux de compagnie.

Technique antérieure

[0002] L'utilisation de micro-organismes probiotiques, comme par exemple des levures ou des bactéries, pour le renforcement de la santé intestinale des animaux de compagnie est connue de l'art antérieur. Plusieurs documents décrivent ainsi l'encapsulation ou la micro-encapsulation de micro-organismes afin d'assurer notamment leur survie dans le tractus gastro-intestinal et de pouvoir ainsi exercer leur bénéfique santé. Le document JP2008013534 décrit plus particulièrement l'encapsulation de bactéries lactiques et de levure dans un polymère comprenant un mélange de xanthane et de chitosan. Le probiotique encapsulé ainsi obtenu est utilisé pour améliorer les troubles gastro-intestinaux chez les animaux de compagnie. L'article de Bruna M. Rodrigues et al. décrit une technique de micro-encapsulation par lyophilisation de souches probiotiques dans le but de maintenir la viabilité des probiotiques pendant leur stockage et d'évaluer leur résistance dans le tractus gastro-intestinal. Les résultats expérimentaux chez le chat montrent que la prise de probiotiques ou de probiotiques encapsulés (avec des fructooligosaccharides) permet de moduler le microbiote intestinal.

[0003] L'utilisation de micro-organismes probiotiques dans des produits alimentaires pour animaux de compagnie est également connue de l'art antérieur. Lorsqu'un micro-organisme ou un mélange de micro-organismes est intégré dans un produit alimentaire telle qu'une croquette enrobée par ledit micro-organisme, il est impératif que le micro-organisme survive non seulement à la phase d'enrobage autour de la croquette, mais également que ledit micro-organisme soit viable jusqu'à la date de péremption de la croquette afin qu'il soit en mesure d'exercer ses effets bénéfiques sur la santé de l'animal. Le document PCT/US2009/056292 décrit l'utilisation de probiotiques (plus particulièrement des bifidobactéries) dans un enrobage de croquettes pour animaux de compagnie. Ce document ne mentionne cependant pas une souche de levure ou une levure qui serait enrobée autour de la croquette et qui présenterait une durée de vie suffisamment longue dans ladite croquette afin d'être efficace sur la santé intestinale d'un

animal de compagnie.

[0004] Il subsiste à ce jour le besoin de trouver de nouveaux probiotiques qui soient efficaces pour le renforcement de la santé intestinale des animaux de compagnie et qui puissent être intégrés dans un produit alimentaire pour animaux de compagnie tout en présentant une durée de vie suffisamment longue au sein dudit produit alimentaire. Une durée de vie suffisamment longue est notamment une durée de vie allant jusqu'à la date de péremption du produit alimentaire.

[0005] De manière inattendue les Inventeurs ont mis au point une levure sèche active qui s'est révélée particulièrement efficace dans le renforcement de la santé intestinale des animaux de compagnie et qui présente en outre une durée de vie particulièrement longue lorsqu'elle est intégrée au sein d'un produit alimentaire pour animaux de compagnie. Une durée de vie particulièrement longue est une durée allant de 12 à 24 mois.

Résumé

[0006] Selon un premier aspect, la présente invention a pour objet une levure *Saccharomyces cerevisiae* obtenue par culture de la souche *Saccharomyces cerevisiae* déposée le 03 mars 2021 auprès de la CNCM sous le numéro I-5660, qui est une levure sèche active présentant les caractéristiques physico-chimiques suivantes :

- une teneur en matières sèches supérieure à 95% en poids et pouvant aller jusqu'à 97% en poids ;
- une activité de l'eau allant de 0,1 à 0,3 ;
- une forme de sphérule ;
- une granulométrie caractérisée par une courbe gaussienne de distribution de la taille montrant qu'au moins 90% des sphérules présentent un diamètre allant de 0,3 à 0,7mm.

Ladite levure sèche active présente avantageusement une durée de vie allant de 24 à 36 mois lorsqu'elle est conservée dans un emballage sous vide et à une température allant de 15 à 25°C, et une durée de vie allant de 12 à 24 mois lorsqu'elle est intégrée au sein d'un facteur d'appétence solide ou un aliment pour animaux de compagnie, comme par exemple une croquette, et que ledit facteur d'appétence ou aliment est conservé à une température allant de 15 à 25°C.

[0007] Selon un deuxième aspect, l'invention concerne la levure telle que définie ci-dessus, pour son utilisation 1/ dans l'amélioration du système immunitaire intestinal chez les animaux de compagnie et/ou 2/ dans le rétablissement d'un microbiote intestinal normal chez les animaux de compagnie.

L'invention concerne également l'utilisation de la levure telle que définie ci-dessus pour améliorer les caractéristiques fécales chez les animaux de compagnie.

[0008] Selon un autre aspect, l'invention a pour objet un facteur d'appétence solide pour

animaux de compagnie qui comprend la levure sèche active telle que définie ci-dessus, ladite levure présentant une durée de vie allant de 12 à 24 mois au sein dudit facteur d'appétence.

[0009] Selon encore un autre aspect, l'invention a pour objet un aliment pour animaux de compagnie qui comprend la levure sèche active ou le facteur d'appétence solide tels que définis ci-dessus, ladite levure présentant une durée de vie allant de 12 à 24 mois au sein dudit aliment.

[0010] L'invention concerne également un aliment tel que défini ci-dessus, pour son utilisation 1/ dans l'amélioration du système immunitaire intestinal chez les animaux de compagnie et/ou 2/ dans le rétablissement d'un microbiote intestinal normal chez les animaux de compagnie.

L'invention concerne encore l'utilisation de l'aliment tel que défini ci-dessus pour améliorer les caractéristiques fécales des animaux de compagnie.

Brève description des dessins

[0011] D'autres caractéristiques, détails et avantages apparaîtront à la lecture de la description détaillée ci-après, et à l'analyse des dessins annexés.

Les figures 1 à 6 comprennent, juste au-dessus des barres juxtaposées dans les histogrammes, des lettres a et b (en caractère minuscule) et/ou des lettres A et B (en caractère majuscule). Les lettres a et b indiquent si les valeurs observées entre les deux groupes sont statistiquement différentes ($p \leq 0,05$) ou non ($p > 0,1$). Les lettres A et B indiquent qu'une tendance statistique est observée ($p = 0,05 - 0,1$).

Les lettres A et B en majuscule au-dessus des barres des histogrammes n'ont évidemment aucun rapport avec les lettres A, B, C ou D données pour différencier les différents schémas au sein d'une même figure.

Les flèches verticales dans les figures 1 à 6 symbolisent un changement brutal de régime alimentaire chez les chiens qui a lieu au jour J22, dénommé « transition alimentaire » dans ce qui suit.

La levure sèche active est représentée par « Sc50 » dans les figures 1 à 6 ci-après.

Fig. 1

[0012] [Fig.1] illustre les valeurs du pH fécal (voir A) et de la concentration en ammoniacque (pourcentage de matières sèches) (voir B) dans des fèces de chiens de race Beagle avant et après une transition alimentaire qui a lieu au jour 22 (J22) (comme indiqué ci-avant la transition alimentaire est signifiée par une flèche verticale).

Le groupe contrôle (histogrammes noirs) a été soumis à un régime alimentaire 1 avant la transition alimentaire et à un régime alimentaire 2 après la transition alimentaire.

Le groupe « Sc50 » (histogrammes blancs) a été soumis à un régime alimentaire 1

supplémenté en levure sèche active Sc50 avant la transition alimentaire et à un régime alimentaire 2 supplémenté en levure sèche active Sc50 après la transition alimentaire.

Fig. 2

[0013] [Fig.2] illustre la teneur en bactéries *Blautia* (voir A), *Bifidobacterium* (voir B), *Lactobacillus* (voir C) et en *Faecalibacterium* (voir D) dans des fèces de chiens de race Beagle avant et après la transition alimentaire à J22. Les groupes testés sont les mêmes que ceux décrits pour la [Fig.1].

Fig. 3

[0014] [Fig.3] illustre la teneur en *E. coli* dans des fèces de chiens de race Beagle avant et après la transition alimentaire à J22. Les groupes testés sont les mêmes que ceux décrits pour la [Fig.1].

Fig. 4

[0015] [Fig.4] illustre l'indice de dysbiose (voir A) du microbiote intestinal et la teneur en streptocoques (voir B) retrouvée dans les fèces des chiens de race Beagle avant et après la transition alimentaire à J22. Les groupes testés sont les mêmes que ceux décrits pour la [Fig.1].

Fig. 5

[0016] [Fig.5] illustre la teneur en immunoglobuline fécale A (IgA) retrouvée dans les fèces des chiens de race Beagle avant et après la transition alimentaire à J22. Les groupes testés sont les mêmes que ceux décrits pour la [Fig.1].

Fig. 6

[0017] [Fig.6] illustre la quantité d'amines biogènes (en mg/kg de matière sèche) présente dans les fèces des chiens de race Beagle avant et après la transition alimentaire à J22. Plus particulièrement, la figure A illustre la quantité d'amines biogènes totales, la figure B illustre la quantité de putrescine et la figure C illustre la quantité de spermidine dans les fèces des chiens de race Beagle avant et après la transition alimentaire à J22. Les groupes testés sont les mêmes que ceux décrits pour la [Fig.1].

Fig. 7

[0018] [Fig.7] illustre la stabilité de la levure sèche active Sc50 au sein de deux facteurs d'appétence différents pour chiens (voir A) et pour chats (voir B).

Fig. 8

[0019] [Fig.8] illustre différents modes de réalisations possibles pour l'enrobage d'une croquette pour chien ou chat.

Dans la figure A le noyau de la croquette est enrobé par une première couche d'enrobage (représentée en gris) constituée de matières grasses (MG) puis par une deuxième couche d'enrobage (représentée en blanc et délimitée par des traits pointillés) constituée d'un facteur d'appétence liquide.

Dans la figure B le noyau de la croquette est enrobé par une première couche d'enrobage (représentée en gris) constituée de matières grasses (MG) puis par une deuxième couche d'enrobage (représentée par des petits carrés en pointillés) constituée d'un facteur d'appétence solide mélangé avec la levure sèche active Sc50 de l'invention.

Enfin dans la figure C le noyau de la croquette est enrobé par une première couche d'enrobage (représentée en gris) constituée de matières grasses (MG), par une deuxième couche d'enrobage (représentée en blanc et délimitée par des traits pointillés) constituée d'un facteur d'appétence liquide puis par une troisième couche d'enrobage (représentée par des petits carrés en pointillés) constituée d'un facteur d'appétence solide mélangé avec la levure sèche active Sc50.

Fig. 9

[0020] [Fig.9] illustre la stabilité de la levure sèche active Sc50 lorsque cette dernière est enrobée autour de croquettes pour chiens.

Dans la figure A le trait continu représente la stabilité de la levure dans la croquette enrobée selon le mode d'enrobage : matière grasse puis « facteur d'appétence solide + levure sèche active Sc50 » puis matière grasse puis facteur d'appétence solide. Le trait discontinu représente la stabilité de la levure dans la croquette enrobée selon le mode d'enrobage : matière grasse puis « facteur d'appétence solide + levure sèche active Sc50 ».

Dans la figure B le trait continu représentant la stabilité de la levure dans la croquette enrobée selon le mode d'enrobage : matière grasse puis « facteur d'appétence solide + levure sèche active Sc50 » puis matière grasse puis facteur d'appétence liquide. Le trait discontinu représente la stabilité de la levure dans la croquette enrobée selon le mode d'enrobage : matière grasse puis « facteur d'appétence solide + levure sèche active Sc50 » puis facteur d'appétence liquide.

Fig.10

[0021] [Fig.10] illustre la stabilité de la levure sèche active Sc50 lorsque cette dernière est enrobée autour de croquettes pour chat. La série représentée à la [Fig.10] correspond à la moyenne des viabilités obtenues à chaque échéance pour les 4 modes d'enrobage suivants :

- matière grasse puis « facteur d'appétence solide + levure sèche active Sc50 » puis matière grasse puis facteur d'appétence solide ;
- matière grasse puis « facteur d'appétence solide + levure sèche active Sc50 » ;
- matière grasse puis « facteur d'appétence solide + levure sèche active Sc50 » puis matière grasse sous vide ;
- matière grasse puis « facteur d'appétence solide + levure sèche active Sc50 » puis

matière grasse sous vide puis facteur d'appétence solide.

Les barres d'erreur représentent +/- 1 écart-type.

Description détaillée

[0022] Ainsi, la présente invention concerne une levure *Saccharomyces cerevisiae* obtenue par culture de la souche *Saccharomyces cerevisiae* déposée le 03 mars 2021 auprès de la CNCM sous le numéro I-5660, qui est une levure sèche active présentant les caractéristiques physico-chimiques suivantes :

- une teneur en matières sèches supérieure à 95% en poids et pouvant aller jusqu'à 97% en poids ;
- une activité de l'eau allant de 0,1 à 0,3 ;
- une forme de sphérule ;
- une granulométrie caractérisée par une courbe gaussienne de distribution de la taille montrant qu'au moins 90% des sphérules présentent un diamètre allant de 0,3 à 0,7mm.

La souche *Saccharomyces cerevisiae* est une souche de levure. L'expression « souche de levure » désigne une population relativement homogène de cellules de levure.

Une souche de levure est obtenue à partir de l'isolement d'un clone, un clone étant une population de cellules obtenue à partir d'une seule cellule de levure. La souche déposée auprès de la CNCM sous le numéro I-5660 est également identifiée sous la référence « Sc50 ». Cette souche peut notamment être désignée « souche Sc I-5660 » « souche I-5660 » ou « souche Sc50 » dans la présente demande.

La levure *Saccharomyces cerevisiae* obtenue par culture de la souche I-5660 peut être désignée par « levure Sc I-5660 », « levure I-5660 » ou « levure Sc50 ».

A titre indicatif, la levure I-5660 peut être obtenue par culture de la souche I-5660 dans un milieu de culture, par exemple comme décrit dans le livre de référence « Yeast Technology, 1991, G. Reed et T.W. Nagodawithana, ISBN 0-442-31892-8 ».

La levure I-5660 peut cependant également être obtenue par un procédé à l'échelle industrielle qui consiste à préparer une crème de levure liquide ou levure liquide qui comprend les étapes suivantes :

- culture de la souche de levure dans un milieu de culture en plusieurs stades, d'abord en semi-anaérobiose, puis en aérobiose,
- séparation par centrifugation de la levure ainsi produite de son milieu de culture, pour obtenir une crème de levure liquide ou levure liquide contenant de 12 à 25% de matière sèche, voire une quantité plus élevée de matière sèche, en particulier si la crème de levure liquide ou levure liquide est mélangée avec des produits osmolytes.

La crème de levure liquide ou levure liquide I-5660 obtenue à l'issue du procédé de

culture ci-dessus décrit est ensuite soumise à un procédé de déshydratation et de séchage qui comprend les étapes suivantes :

- mélange de la crème de levure liquide ou levure liquide I-5660 avec une saumure à base de chlorure de sodium pour obtenir un volume de crème de levure comprenant une saumure à base de chlorure de sodium,
- déshydratation du volume de crème de levure comprenant une saumure à base de chlorure de sodium pour obtenir une levure déshydratée,
- extrusion de la levure déshydratée pour obtenir une levure extrudée,
- séchage de la levure extrudée de manière à obtenir une levure sèche ayant un taux de matières sèches supérieur à 95% en poids par rapport au poids total de la levure.

La levure I-5660 obtenue à l'issue de ce procédé de déshydratation et de séchage est dénommée « levure sèche active ». Elle pourra indifféremment être désignée dans la présente demande « levure sèche active Sc I-5660 », « levure sèche active I-5660 », « levure sèche active Sc50 » ou simplement « levure sèche active ».

Le terme « levure active » est synonyme de levure vivante et désigne une population de cellules de levure qui sont métaboliquement actives.

Une « levure sèche active » désigne, au sens de la présente demande, une levure active présentant un taux de matières sèches supérieur à 95% en poids pouvant aller jusqu'à 97% en poids.

Le taux de matières sèches a été évalué selon la méthode de dessiccation, après passage dans un four pendant 17 heures minimum à une température de 103°C.

L'activité de l'eau a été évaluée selon la technique du point de rosée à miroir refroidi, à l'aide d'un AquaLab. Il s'agit d'une mesure primaire de l'humidité relative.

La levure sèche active se présente sous la forme de sphérules qui présentent une surface de très faible porosité et une structure interne très densifiée, ce qui confère entre autres auxdites sphérules un effet barrière à l'humidité.

Ces sphérules présentent une granulométrie caractérisée par une courbe gaussienne de distribution de la taille montrant qu'au moins 90% des sphérules présentent un diamètre allant de 0,3 à 0,7mm.

La granulométrie a été évaluée par voie sèche à l'aide d'un granulomètre laser.

[0023] Selon un mode de réalisation particulièrement avantageux de l'invention, la levure sèche active Sc50 est encore caractérisée en ce qu'elle présente une stabilité, dans un emballage sous-vide et à une température allant de 15 à 25°C, d'au moins 24 mois, et de préférence allant de 24 à 36 mois.

La stabilité de la levure sèche active de l'invention est directement reliée à son taux de viabilité, c'est-à-dire au nombre de cellules viables que contient la levure sèche active. Un moyen de mesurer la viabilité des cellules de la levure est de compter le nombre de cellules revivifiables (en UFC/g ou en log UFC/g). Les « cellules revivifiables »

vifiables » sont des cellules viables et capables de se multiplier. Le terme UFC signifie « unité formant colonie ». Un UFC correspond à une colonie. La viabilité des cellules a été mesurée selon la méthode normalisée EN15789.

Au sens de la présente demande, une levure sèche active stable sur une période d'au moins 24 mois, et de préférence allant de 24 à 36 mois, signifie que son nombre de cellules vivantes et métaboliquement actives (UFC/g) ne diminue pas de plus d'un log UFC/g sur une période d'au moins 24 mois, et de préférence allant de 24 à 36 mois. Cela signifie par exemple que si la levure sèche active présente un nombre de cellules vivantes et métaboliquement actives de 1×10^{10} UFC/g (équivalent à 10 log UFC/g) au temps t_0 (t_0 étant le moment d'obtention de la levure sèche active, à savoir le moment où la levure sèche active vient d'être préparée) alors la levure présentera à l'issue d'une période d'au moins 24 mois, et de préférence allant de 24 à 36 mois, un nombre de cellules vivantes et métaboliquement actives qui ne sera pas inférieur 1×10^9 UFC/g (équivalent à 9 log UFC/g).

La stabilité d'au moins 24 mois, et de préférence allant de 24 à 36 mois, de la levure sèche active objet de l'invention est vérifiée lorsque ladite levure est stockée dans un emballage sous-vide et à une température allant de 15 à 25°C.

Ainsi, au sens de la présente demande, la stabilité de la levure sèche active sur une période d'au moins 24 mois, et de préférence allant de 24 à 36 mois, signifie que la levure sèche active présente une durée de vie d'au moins 24 mois, et de préférence allant de 24 à 36 mois, selon les critères indiqués ci-dessus (seuil de perte de viabilité inférieur ou égal à 1 log UFC/g). Cette durée de vie/stabilité est extrêmement avantageuse puisque de cette manière la levure sèche active conserve ses propriétés, à savoir notamment améliorer la santé intestinale des animaux de compagnie.

[0024] Selon un mode de réalisation avantageux, l'invention a pour objet une levure sèche active Sc50 qui présente les caractéristiques suivantes :

- une teneur en matières sèches supérieure à 95% en poids et pouvant aller jusqu'à 97% en poids ;
- une activité de l'eau allant de 0,1 à 0,3 ;
- une forme de sphérule ;
- une granulométrie caractérisée par une courbe gaussienne de distribution de la taille montrant qu'au moins 90% des sphérules présentent un diamètre allant de 0,3 à 0,7mm.- une teneur en matières sèches supérieure à 95% en poids et pouvant aller jusqu'à 97% en poids ;
- une stabilité, dans un emballage sous-vide et à une température allant de 15 à 25°C, d'au moins 24 mois, et de préférence allant de 24 à 36 mois.

[0025] L'invention a également pour objet la levure sèche active Sc50 telle que ci-dessus définie pour son utilisation :

- dans l'amélioration du système immunitaire intestinal chez les animaux de compagnie et/ou,
- dans le rétablissement d'un microbiote intestinal normal chez les animaux de compagnie.

Les animaux de compagnie désignent des animaux domestiques comme notamment des chiens, chats, lapins, oiseaux, hamsters etc. A titre d'exemples plus particuliers d'animaux de compagnie on pourra citer les chiens et les chats.

Chez l'homme comme chez l'animal de compagnie, un grand nombre des cellules immunitaires se situent dans l'intestin, ce qui illustre bien l'importance du système immunitaire intestinal. Le tube digestif est en permanence agressé par une multitude d'antigènes et de pathogènes, c'est pourquoi celui-ci dispose d'un système immunitaire complexe et très développé.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, l'administration de la levure sèche active Sc50 chez les animaux de compagnie permet d'augmenter de façon significative la production des immunoglobulines fécales.

Le microbiote intestinal, qui désigne l'ensemble des micro-organismes qui vivent dans le tube digestif, joue un rôle essentiel dans le maintien de la bonne santé intestinale. Il participe d'ailleurs pleinement au fonctionnement du système immunitaire intestinal. La dysbiose est une modification de la composition et/ou de la diversité microbienne du tube digestif. Elle peut entraîner une surpopulation de bactéries pathogènes, une réaction inflammatoire aiguë ainsi que des diarrhées. Toute altération de l'environnement intestinal peut provoquer un changement dans le microbiote et donc causer une dysbiose. L'indice de dysbiose du microbiote propose notamment un aperçu de la santé intestinale globale et établit généralement la présence ou non d'une dysbiose.

Un microbiote intestinal « normal » est un microbiote sain, ne présentant pas de modification de la composition et/ou de la diversité microbienne du tube digestif.

L'administration de la levure sèche active Sc50 chez les animaux de compagnie présentant un microbiote intestinal altéré permet de rétablir un microbiote intestinal normal. En effet, selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, l'administration de la levure sèche active Sc50 chez les animaux de compagnie présentant un microbiote intestinal altéré permet :

- une diminution significative de la teneur en streptocoques fécaux et de *Escherichia Coli* fécal,
- un effet significatif sur l'amélioration de l'indice de dysbiose,
- une augmentation significative de la teneur des bactéries *Blautia*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* et *Faecalibacterium*.

Les bactéries *Blautia*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* et *Faecalibacterium* sont des

bactéries bénéfiques au maintien de la bonne santé intestinale.

[0026] L'invention concerne encore l'utilisation de la levure sèche active Sc50 pour améliorer les caractéristiques fécales chez les animaux de compagnie.

On entend notamment par « améliorer les caractéristiques fécales », une diminution du pH fécal, une diminution de la production de catabolites putréfactifs tels que l'ammoniaque, une diminution de la production des amines biogènes (comme par exemple la spermidine et la putrescine).

La réduction des catabolites putréfactifs dans les fèces des animaux de compagnie permet notamment de contribuer à la réduction des mauvaises odeurs des selles qui constituent une réelle nuisance pour les propriétaires des animaux de compagnie.

[0027] Selon encore un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, la levure sèche active Sc50, pour une des utilisations telles que ci-dessus définie, est utilisée à une dose quotidienne allant de 1×10^8 à $1,5 \times 10^8$ UFC/animal.

[0028] L'invention a encore pour objet un probiotique ou complément alimentaire pour animaux de compagnie, caractérisé en ce qu'il comprend la levure sèche active Sc50.

Les termes « probiotique » et « complément alimentaire » employés ci-dessus signifient que la levure sèche active Sc50 joue le rôle d'un probiotique ou d'un complément alimentaire.

En 2001, les probiotiques ont été définis par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) comme 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 ».

D'après la définition donnée par la Directive 2002/46/CE du Parlement européen « les compléments alimentaires sont des denrées alimentaires dont le but est de compléter le régime alimentaire normal et qui constituent une source concentrée de nutriments ou d'autres substances ayant un effet nutritionnel ou physiologique seuls ou combinés, commercialisés sous forme de doses ».

Le probiotique ou le complément alimentaire de l'invention comprend au moins 95% en poids de la levure sèche active Sc50, et de préférence de 96 à 99% en poids. Les autres ingrédients constituant le probiotique ou le complément alimentaire pourront par exemple être de l'amidon, mais également des vitamines, des minéraux alimentaires, des oligo-éléments et/ou des enzymes alimentaires.

Selon un mode de réalisation de l'invention, le probiotique ou complément alimentaire pourra se trouver sous une forme adaptée pour une administration par voie orale, comme par exemple des comprimés, des gélules, des granules, des poudres etc.

L'administration du probiotique ou complément alimentaire de l'invention pourra se faire en dehors des repas ou au contraire au moment des repas des animaux de compagnie. Dans ce dernier cas le probiotique ou complément alimentaire pourra par

exemple être mélangé avec le repas de l'animal.

Selon encore un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, le probiotique ou complément alimentaire est administré en une quantité allant de 9 à 900 mg/jour/animal

Selon encore un autre mode de réalisation, l'invention a pour objet l'utilisation du probiotique ou complément alimentaire tel que ci-dessus défini, dans un aliment pour animaux de compagnie, ledit aliment étant de préférence une croquette pour chiens ou chats.

[0029] La levure sèche active Sc50 de l'invention présente l'avantage de pouvoir être facilement dispersée dans un ingrédient alimentaire, comme par exemple un facteur d'appétence destiné à être intégré dans des produits alimentaires pour animaux de compagnie. En effet, la levure sèche active, lorsqu'elle est mélangée à un ingrédient alimentaire, ne produit pas d'effet de décantation ou d'agglomération au cours du temps, et présente avantageusement une viabilité allant de 12 à 24 mois au sein dudit ingrédient alimentaire. Selon un autre mode de réalisation avantageux, l'invention a pour objet l'utilisation de la levure sèche active Sc50 dans un facteur d'appétence solide pour animaux de compagnie.

Le facteur d'appétence se trouve par exemple sous la forme d'une poudre et a pour objectif d'accroître l'attractivité des animaux de compagnie pour les aliments qui leur sont destinés. L'ajout d'un facteur d'appétence dans un aliment permet d'augmenter de manière significative la consommation de cet aliment par l'animal de compagnie. Les facteurs d'appétence peuvent être considérés comme des arômes ou autres facteurs de goût.

A titre d'exemples de facteurs d'appétence on pourra citer des viscères de volaille (poulet ou dinde par exemple), des foies de porc ou de volaille ou encore des matières grasses (beurre ou fromage par exemple).

[0030] A cet égard l'invention a encore pour objet un facteur d'appétence solide destiné à être intégré dans des aliments pour animaux de compagnie, caractérisé en ce qu'il comprend une levure sèche active telle que définie ci-dessus, ladite levure présentant une durée de vie allant de 12 à 24 mois au sein dudit facteur d'appétence.

Ces conditions de durée de vie de la levure sèche active sont observées lorsque le facteur d'appétence est conservé à une température allant de 15 à 25°C.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, le facteur d'appétence présente une teneur en eau inférieure à 10 %.

La durée de vie de 12 à 24 mois de la levure sèche active au sein dudit facteur d'appétence signifie qu'elle présente un seuil de perte de viabilité inférieur ou égal à 1 log UFC/g sur une période allant de 12 à 24 mois, et de préférence un seuil de perte de viabilité allant de 0,1 log UFC/g à 0,8 log UFC/g sur une période allant de 12 à 24

mois. Cela signifie par exemple que si la levure sèche active vivante est présente en une quantité de 1×10^7 UFC/g de facteur d'appétence, immédiatement après l'avoir mélangé audit facteur d'appétence (appelé temps T0), alors à l'issue d'une période allant de 12 à 24 mois à compter du temps T0 (T0 étant le moment où la levure sèche active vivante est mélangée au facteur d'appétence), la quantité de levure sèche active vivante n'est pas inférieure à 1×10^6 UFC/g de facteur d'appétence.

Cette durée de vie est extrêmement avantageuse puisque de cette manière la levure sèche active Sc50 conserve ses propriétés biologiques lorsqu'elle est utilisée en association avec un facteur d'appétence (à savoir améliorer la santé intestinale des animaux de compagnie).

Selon encore un autre mode de réalisation de l'invention, le poids de la levure sèche active dans le facteur d'appétence solide varie de 1 à 40 %, et plus particulièrement de 2 à 35 % par rapport au poids total du facteur d'appétence.

[0031] La présente invention a également pour objet l'utilisation de la levure sèche active Sc50 telle que définie ci-dessus ou d'un facteur d'appétence solide tel que défini ci-dessus, dans un aliment pour animaux de compagnie, ledit aliment étant de préférence une croquette.

On entend par « aliment pour animaux de compagnie », un produit alimentaire ou une composition alimentaire destiné(e) à être ingéré(e) par un animal de compagnie, comme par exemple un chien ou un chat. A titre d'exemple d'un tel aliment on pourra citer une croquette pour les animaux de compagnie, et plus particulièrement une croquette pour chiens ou chats.

[0032] Selon un mode de réalisation de l'invention, la levure sèche active Sc50 ou le facteur d'appétence solide est intégré(e) au sein de l'aliment ou alors est déposé(e) par enrobage autour de l'aliment.

L'intégration de la levure sèche active ou du facteur d'appétence au sein de l'aliment signifie par exemple que la levure ou le facteur d'appétence peut être mélangé(e) directement au sein de l'aliment lors de sa fabrication de sorte que l'aliment comprenne ladite levure ou ledit facteur d'appétence dans sa composition même. Cependant cela peut aussi signifier que la levure ou le facteur d'appétence est mélangé(e) à l'aliment au moment de la prise de repas de l'animal.

Lorsque la levure est intégrée au sein de l'aliment au moment de la fabrication de l'aliment, alors il s'agira de préférence de la levure sèche active en tant que telle.

Lorsque la levure est mélangée à l'aliment au moment de la prise de repas de l'animal, alors ladite levure se trouve de préférence sous la forme d'un probiotique ou d'un complément alimentaire.

Selon un mode de réalisation préféré, la levure sèche active ou le facteur d'appétence est déposé(e) par enrobage autour de l'aliment, ledit aliment étant par exemple une

croquette pour chiens ou chats.

Les tests de viabilité de la levure sèche active, lorsque cette dernière est enrobée autour de la croquette, ont avantageusement montré que ladite levure présentait une durée de vie/stabilité allant de 12 à 24 mois. Ces résultats sont particulièrement intéressants et prometteurs car ils représentent une durée de vie extrêmement avantageuse. La stabilité de la levure sèche active de l'invention est directement reliée à son taux de viabilité à la fin de la période d'utilisation de la croquette.

La stabilité de la levure sèche active de l'invention, lorsqu'elle est utilisée dans un aliment, dans un facteur d'appétence, dans un probiotique ou dans un complément alimentaire, est définie au regard de son seuil de perte de viabilité dans ledit aliment, facteur d'appétence, probiotique ou complément alimentaire.

Plus particulièrement, la stabilité de la levure de l'invention, dans un aliment, un facteur d'appétence, un probiotique ou un complément alimentaire, sur une période allant de 12 à 24 mois, signifie qu'elle présente un seuil de perte de viabilité inférieur ou égal à 1 log UFC/g sur une période allant de 12 à 24 mois, et de préférence un seuil de perte de viabilité allant de 0,1 à 0,8 log UFC/g sur une période allant de 12 à 24 mois. Cela signifie par exemple que si la levure sèche active vivante est présente en une quantité de 1×10^7 UFC/g d'aliment, de facteur d'appétence, de probiotique ou de complément alimentaire, immédiatement après que ladite levure ait été incorporée dans ledit aliment, facteur d'appétence, probiotique ou complément alimentaire (appelé temps T0), alors à l'issue d'une période allant de 12 à 24 mois à compter du temps T0 (T0 = moment où la levure sèche active est incorporée dans l'aliment, facteur d'appétence, probiotique ou complément alimentaire), la quantité de levure sèche active vivante n'est pas inférieure à 1×10^6 UFC/g d'aliment, de facteur d'appétence, de probiotique ou de complément alimentaire.

Cette durée de vie est extrêmement avantageuse puisque de cette manière la levure sèche active Sc50 conserve ses propriétés biologiques lorsqu'elle est intégrée au sein d'un aliment, facteur d'appétence, probiotique ou complément alimentaire (à savoir améliorer la santé intestinale des animaux de compagnie).

Ces conditions de durée de vie de la levure sèche active sont observées lorsque l'aliment, le facteur d'appétence, le probiotique ou le complément alimentaire est conservé à une température allant de 15 à 25°C.

[0033] Selon un mode de réalisation particulièrement avantageux, l'invention a pour objet un aliment pour animaux de compagnie, caractérisé en ce qu'il comprend une levure sèche active telle que définie ci-dessus ou un facteur d'appétence tel que défini ci-dessus, ladite levure présentant une durée de vie allant de 12 à 24 mois au sein dudit aliment.

Un autre objet de l'invention réside dans un probiotique ou complément alimentaire

tel que ci-dessus défini, qui est encore caractérisé en ce qu'il comprend une levure sèche active telle que définie ci-dessus, présentant une durée de vie allant de 12 à 24 mois.

La durée de vie de la levure sèche active au sein dudit aliment, probiotique ou complément alimentaire est telle que définie précédemment (i.e. un seuil de perte de viabilité inférieur ou égal à 1 log UFC/g, et de préférence allant de 0,1 à 0,8 log UFC/g sur une période allant de 12 à 24 mois).

La variabilité de la durée de vie de la levure sèche active dans l'aliment pour animaux de compagnie dépend notamment de l'activité de l'eau dudit aliment.

Ainsi la levure sèche active Sc50 de l'invention présente une durée de vie :

- de 12 mois lorsqu'elle est présente dans un aliment présentant une activité de l'eau forte, à savoir supérieure à 0,5 ;
- de 24 mois lorsqu'elle est présente dans un aliment présentant une activité de l'eau faible, à savoir inférieure à 0,5, et de préférence inférieure à 0,4.

Selon encore un autre mode de réalisation de l'invention, la levure Sc50 est administrée en une quantité allant de 5×10^5 à 5×10^9 UFC/g d'aliment.

[0034] Selon un mode de réalisation avantageux, l'aliment de l'invention est plus particulièrement une croquette enrobée par au moins une couche d'enrobage, ladite couche comprenant une levure sèche active telle que définie ci-dessus ou un facteur d'appétence tel que défini ci-dessus.

Classiquement une croquette ou croquette enrobée pour animaux de compagnie est constituée d'un cœur ou noyau, ledit cœur ou noyau étant enrobé par au moins une couche d'enrobage. La croquette de l'invention désigne plus particulièrement une croquette enrobée. Les termes « croquette »/« croquette enrobée » ainsi que les termes « cœur »/ « noyau » peuvent être employés indifféremment dans ce qui suit.

La couche d'enrobage peut couvrir toute la surface du noyau ou seulement une partie de la surface du noyau. Selon un mode de réalisation préféré de l'invention la couche d'enrobage couvre l'ensemble de la surface du noyau.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, les pourcentages en poids, par rapport au poids total de la croquette, varient de :

- 50 à 97% pour le noyau, de préférence de 80 à 95%,
- 3 à 50% pour la couche d'enrobage, de préférence de 5 à 20%.

A cet égard l'aliment de l'invention est plus particulièrement caractérisé en ce que la couche d'enrobage est présente en une quantité en poids allant de 3 à 50%, et de préférence de 5 à 20% par rapport au poids total de l'aliment.

Le noyau de la croquette présente une teneur en eau inférieure à 10%.

Le noyau de la croquette peut par exemple comprendre des protéines d'origine animale ou végétale, des carbohydrates, des matières grasses d'origine animale ou

végétale, des minéraux, des vitamines etc.

Selon un mode de réalisation avantageux, la couche d'enrobage comprend, outre la levure sèche active de l'invention ou le facteur d'appétence solide, une matière grasse. A titre d'exemple, une croquette de l'invention pourra être constituée d'un noyau, d'une première couche d'enrobage constituée d'une matière grasse et d'une deuxième couche d'enrobage comprenant un facteur d'appétence solide, ledit facteur d'appétence comprenant la levure sèche active de l'invention.

Toujours à titre d'exemple, la croquette pourra être constituée d'un noyau et d'une couche d'enrobage comprenant une matière grasse et la levure sèche active Sc50 ou un facteur d'appétence comprenant la levure sèche active.

[0035] L'invention a également pour objet un aliment tel que ci-dessus défini, pour son utilisation :

- dans l'amélioration du système immunitaire intestinal chez les animaux de compagnie et/ou,
- dans le rétablissement d'un microbiote intestinal normal chez les animaux de compagnie.

Enfin, un autre objet de l'invention est l'utilisation d'un aliment tel que ci-dessus défini pour améliorer les caractéristiques fécales des animaux de compagnie.

Les améliorations notées pour l'utilisation de la levure sèche active Sc50 seule quant à la santé intestinale des animaux de compagnie (amélioration du système immunitaire intestinal, rétablissement d'un microbiote intestinal normal, amélioration des caractéristiques fécales) s'appliquent pour l'utilisation des aliments qui comprennent la levure sèche active de l'invention, et en particulier aux croquettes enrobées par une couche d'enrobage comprenant la levure sèche active de l'invention ou le facteur d'appétence de l'invention. Cela est notamment dû au fait que la levure sèche active de l'invention présente une excellente stabilité/durée de vie au sein dudit aliment (allant de 12 à 24 mois), ce qui signifie qu'elle ne présente aucune perte d'activité et que ladite levure sèche active est donc apte à exercer ses bénéfices sur la santé intestinale des animaux de compagnie.

[0036] **Exemple 1 : étude de l'efficacité de la levure sèche active Sc50 sur la santé intestinale**

[0037] L'objectif de cet exemple, qui fait référence aux figures 1 à 6, est d'évaluer l'effet d'une supplémentation alimentaire quotidienne en levure sèche active Sc50 chez des chiens adultes en bonne santé sur leur santé intestinale après une transition alimentaire brutale. On entend par « transition alimentaire brutale » un changement brutal de régime alimentaire.

[0038] Protocole des études réalisées

L'étude a été menée sur quarante chiens de race Beagle adultes en bonne santé (vingt

mâles et vingt femelles), de poids moyen corporel allant de 10 à 15 kg.

L'étude a été répétée deux fois et été approuvée par le Comité d'éthique de l'utilisation des animaux.

Deux groupes différents sont étudiés : avec ou sans supplémentation en levure sèche active Sc50. La levure sèche active Sc50 (comprenant 1×10^{10} UFC de cellules vivantes et métaboliquement actives par gramme de levure sèche active) est administrée à une dose de 150 mg par jour et par chien.

L'étude est effectuée en deux temps :

- une phase 1 qui dure 3 semaines (du jour 1 au jour 21 (J1 à J21)) et,
- une phase 2 qui dure 4 semaines (du jour 22 au jour 49 (J22 à J49)).

Au jour 1 de la phase 2, à savoir au jour 22 (J22) les chiens subissent un changement brutal de régime alimentaire (appelé « transition alimentaire » dans ce qui suit et représenté par la flèche verticale dans les figures 1 à 6).

La phase 1 se déroule donc avant la transition alimentaire et la phase 2 démarre le premier jour de la transition alimentaire, à J22.

[0039] Phase 1 :

- groupe A : groupe contrôle recevant le régime alimentaire 1 (représenté par « Contrôle » dans les figures 1 à 6),
- groupe B : groupe recevant le régime alimentaire 1 supplémenté en levure sèche active Sc50 (représenté par « Sc50 » dans les figures 1 à 6).

Le régime alimentaire 1 consiste en un aliment standard et équilibré pour un chien, qui présente une teneur faible en fibres, à savoir de l'ordre de 1 à 3%.

[0040] Phase 2 :

- groupe A : groupe contrôle recevant le régime alimentaire 2 (représenté par « Contrôle » dans les figures 1 à 6),
- groupe B : groupe recevant le régime alimentaire 2 supplémenté en levure sèche active Sc50 (représenté par « Sc50 » dans les figures 1 à 6).

Le régime alimentaire 2 consiste en un aliment présentant une teneur élevée en fibres, à savoir de l'ordre de 12 à 13%.

La transition brutale d'un régime bas en fibres à un régime haut en fibres est effectuée pour créer une dysbiose intestinale.

[0041] Paramètres évalués

1/ Des échantillons de fèces ont été collectés pour l'analyse du pH fécal ([Fig.1], A) et de la concentration en ammoniacque fécal ([Fig.1], B).

Le pH fécal a été mesuré directement sur des échantillons de matières fécales fraîches à l'aide d'un pH mètre digital. La concentration en ammoniacque fécale ([N]) (gr/kg) a été déterminée selon la méthode décrite par Brito et al., 2010 et a plus particulièrement été calculée en appliquant le facteur de correction 0,9875 selon la formule

ci-dessous :

[0042] [Math.1]

[N]

$$= N \times \text{facteur de correction} \times 17 \times \frac{\text{Vacide dans l'échantillon testé} - \text{Vacide dans l'échantillon contrôle}}{\text{poids de l'échantillon en grammes}}$$

2/ La population bactérienne présente dans le microbiote intestinal (figure 2, A, B, C, D, figure 3 et figure 4, B) ainsi que l'indice de dysbiose (figure 4, A) ont également été analysés suivant une méthodologie de PCR (polymerase-chain-reaction) quantitative publiée dans le journal FEMS Microbiology Ecology (AlShawaqfeh et al., 2017).

La population bactérienne est exprimée en logarithme de l'ADN.

L'indice de dysbiose permet d'analyser le microbiote fécal, et plus particulièrement de quantifier les bactéries suivantes : *Faecalibacterium*, *Fusobacterium*, *Clostridium hiranonis*, *Blautia*, *Streptocoque*, *Escherichia coli* et *Turicibacter*. Ces bactéries ont en effet été identifiées dans la littérature comme étant altérées dans certaines pathologies digestives (par exemple les entéropathies chroniques) et/ou en réponse à un traitement antibiotique. L'indice de dysbiose permet d'évaluer des intervalles de référence de ces bactéries ainsi que des valeurs exprimant l'étendue de la dysbiose intestinale. Ainsi, on parle de dysbiose du microbiote fécal lorsque l'indice de dysbiose est supérieur à 2. Un indice de dysbiose allant de 0 à 2 indique une altération modérée dans le microbiote fécale. On parle de microbiote normal quand l'indice de dysbiose est négatif.

[0043] Résultats obtenus

La levure sèche active de l'invention Sc50 a été bien acceptée et tolérée par les chiens dans les deux études. Aucun épisode de refus de nourriture, de vomissement, de diarrhée et aucune perte de poids n'ont été observés tout au long de l'étude, même pendant la transition alimentaire. Des résultats encourageants et comparables ont été rapportés et sont résumés ci-après.

[0044] Effets de la levure sèche active Sc50 sur la production fermentaire ([Fig.1])

Une diminution significative du pH fécal ([Fig.1], A) à J35 et J49 et de l'ammoniaque fécal ([Fig.1], B) à J23, J35 et J49 a été observée après la transition alimentaire.

[0045] Effet de la levure sèche active Sc50 sur le microbiote intestinal ([Fig.2], [Fig.3], [Fig.4], B) et l'indice de dysbiose ([Fig.4], A)

Une augmentation significative de la teneur en *Blautia* (J49) ([Fig.2], A), *Bifidobacterium* (J21 et J49) ([Fig.2], B), *Lactobacillus* (J21 et J49) ([Fig.2], C) et *Faecalibacterium* (J49) ([Fig.2], D) a été observée après la transition alimentaire dans les fèces des chiens.

Une diminution significative du contenu fécal en streptocoques –(J35) ([Fig.4], B) a été observée après la transition alimentaire. Une diminution significative du contenu

fécal en *Escherichia Coli* après la transition alimentaire (J49) ainsi qu'une tendance à la diminution avant la transition alimentaire (J21) ([Fig.3]) a également été observée. De même, une amélioration de l'indice de dysbiose avant et après la transition alimentaire a été observée dans le microbiote intestinal des chiens (J21, J23 et J35) ([Fig.4], A). L'indice de dysbiose permet en effet d'évaluer comment le microbiote intestinal se normalise en réponse à un changement de traitement, en l'occurrence la transition alimentaire rapide d'un régime 1 à un régime 2.

[0046] Effet de la levure sèche active Sc50 sur la production d'immunoglobuline A fécale (IgA) ([Fig.5])

Il ressort de la [Fig.5] que l'administration de la levure sèche active Sc50 entraîne une augmentation significative de la production d'IgA dans les fèces des chiens avant (J21) et après (J35) la transition alimentaire.

[0047] Effet de la levure sèche active Sc50 sur la production d'amines biogènes ([Fig.6])

Une diminution significative de la production d'amines biogènes totales avant (J21) et après la transition alimentaire (J49) a été observée chez les chiens. Plus particulièrement une diminution significative de la spermidine a été observée après la transition alimentaire (J49) ainsi qu'une diminution significative de la putrescine avant la transition alimentaire (J21) et une tendance à la diminution après la transition alimentaire (J49) chez les chiens.

[0048] Conclusions

La supplémentation en levure sèche active Sc50 dans le régime alimentaire de chiens en bonne santé soumis à une transition alimentaire brutale contribue à :

a) L'amélioration des caractéristiques fécales des chiens testés grâce à la diminution du pH fécal et de la production de catabolites putréfactifs. En effet, la diminution de la concentration en ammoniacque fécal a été signalée comme limitant la réplication de micro-organismes pathogènes dans l'intestin. De plus, la diminution des amines biogènes contribue à une réduction de l'odeur fécale, ce qui est une caractéristique commerciale importante compte tenu de la relation étroite entre les chiens et leurs propriétaires.

b) L'amélioration de l'immunité locale par une augmentation de la production d'IgA fécale qui contribue à une plus grande résistance locale à l'invasion d'antigènes et peut limiter l'absorption d'antigènes protéiques et la neutralisation des virus.

c) La modulation de la composition et de l'activité du microbiote intestinal, par exemple par une diminution des bactéries comme les streptocoques et *Escherichia Coli*, qui sont décrits dans la littérature comme étant associés à des processus inflammatoires dans certaines pathologies digestives et augmentation des bactéries bénéfiques du microbiote intestinal. De plus, la supplémentation en levure sèche active Sc50 a permis d'améliorer l'indice de dysbiose.

[0049] **Exemple 2 : étude de la stabilité de la levure sèche active Sc50 dans des aliments pour chiens et chats**

[0050] L'objectif de cet exemple, qui fait référence aux figures 7 à 10, est d'évaluer la stabilité de la levure sèche active Sc50 :

- au sein de deux facteurs d'appétence solides pour chien ou pour chat,
- au sein d'une croquette pour chien ou pour chat, à savoir en enrobage autour du noyau de la croquette.

[0051] Mélange de la levure sèche active Sc50 de l'invention avec des facteurs d'appétence sous forme de poudre pour chien ou pour chat

La levure sèche active Sc50 est incorporée à 5% respectivement dans des facteurs d'appétence sous forme de poudre pour chien ou pour chat, lesdits facteurs d'appétence étant composés de co-produits de porc et volaille, protéines d'origine végétale, carbohydrates et minéraux. Les facteurs d'appétence poudre se distinguent par des activités à l'eau différente, à savoir :

- une activité à l'eau de 0,32 ou de 0,38 pour les 2 facteurs d'appétence pour chiens,
- une activité à l'eau de 0,30 ou de 0,35 pour les 2 facteurs d'appétence pour chats.

Le mélange « facteur d'appétence + levure sèche active Sc50 » est effectué dans un mélangeur commercialisé sous la dénomination Forberg (mélangeur à double arbre à pâles) en introduisant d'abord la totalité du facteur d'appétence poudre dans le mélangeur, puis la levure sèche active Sc50. Le mélange est ensuite lancé pendant 5 min à une vitesse de 50Hz.

[0052] Etude de la stabilité de la levure sèche active Sc50 au sein du facteur d'appétence

Le facteur d'appétence additionné de la levure sèche active Sc50 est ensuite conditionné dans des sachets plastiques (pour les facteurs d'appétence pour chiens) ou dans des sachets aluminium (pour des facteurs d'appétence pour chats) et est stocké à température ambiante (20°C +/- 5°C).

La mesure de la viabilité de la levure sèche active Sc50 est réalisée à différentes échéances (au moins 4) sur la totalité de la durée de l'étude, à savoir de 0 à 12 mois. Le marqueur de stabilité suivi pendant le stockage de la levure sèche active Sc50 est le taux de cellules de levures revivifiables, ledit taux étant mesuré selon la méthode normalisée NF EN 15789. Les résultats de viabilité de la levure sèche active Sc50 au sein des divers facteurs d'appétence sont représentés à la [Fig.7].

Plus particulièrement, la [Fig.7] A illustre la stabilité de la levure sèche active Sc50 dans deux facteurs d'appétence pour chiens, le trait continu représentant la stabilité dans le facteur d'appétence ayant une activité à l'eau de 0,32 et le trait discontinu représentant la stabilité dans le facteur d'appétence ayant une activité à l'eau de 0,38.

La [Fig.7] B illustre la stabilité de la levure sèche active Sc50 dans deux facteurs d'appétence pour chats, le trait continu représentant la stabilité dans le facteur

d'appétence ayant une activité à l'eau de 0,30 et le trait discontinu représentant la stabilité dans le facteur d'appétence ayant une activité à l'eau de 0,35.

[0053] Remarques et conclusion

Il ressort des figures 7A et 7B que la levure sèche active Sc50 de l'invention présente d'excellentes performances de stabilité lorsqu'elle est incorporée à des facteurs d'appétence.

Les résultats montrent que sur la période des 12 mois dans les conditions de stockage testées (20 +/-5°C), la viabilité de la levure sèche active Sc50 est stable dans les 4 facteurs d'appétence chiens et chats testés ayant des activités à l'eau allant de 0,30 à 0,38. Ainsi, l'écart de viabilité dans ces 4 facteurs d'appétence après 12 mois de contact est inférieur à 1 log UFC/g par rapport à T0 (moment où la levure active sèche de l'invention est incorporée dans le facteur d'appétence).

[0054] Enrobage du noyau d'une croquette avec le facteur d'appétence comprenant la levure sèche active Sc50

Les différents mélanges « facteur d'appétence + levure sèche active Sc50 » préparés à l'étape précédente sont ensuite appliqués sur des croquettes pour chiens ou chats, selon différentes séquences d'enrobage. Ces mélanges sont appliqués sur les croquettes sitôt préparés. Les études de stabilité de la levure sèche active Sc50 ont été lancées sur une période de 24 mois.

La [Fig.8] illustre trois modes de réalisation possible pour l'enrobage du noyau d'une croquette. Cette figure est seulement donnée à titre d'exemple, car il existe d'autres modes d'enrobage du noyau d'une croquette.

A titre d'exemple, les principaux composants des croquettes pour chats et chiens peuvent être résumés ainsi :

- pour les chiens : orge, blé et dérivés, maïs, farine de volaille, soja entier, graisse de volaille ;
- pour les chats : farine de volaille, orge, maïs et dérivés, graisse de volaille, blé, soja et dérivés.

Dans la croquette, le taux d'incorporation de la levure sèche active Sc50 est de 0,05%.

La levure sèche active Sc50, préalablement incorporée aux facteurs d'appétence poudre, est appliquée sur les croquettes pour chiens ou pour chats selon les différentes modes d'enrobage illustrés dans le tableau 1 ci-dessous. Les abréviations utilisées dans le tableau 1 ont les significations suivantes :

- MG : matière grasse d'enrobage ;
- FAP : facteur d'appétence poudre ;
- FAP + Sc50 : facteur d'appétence poudre additionné de levure sèche active Sc50 ;
- FAL : facteur d'appétence liquide.

MG sous-vide signifie que la matière grasse d'enrobage a été déposée sur la croquette alors que le vide a été appliqué dans l'équipement (cela permet de favoriser la pénétration de la matière grasse dans le corps de la croquette).

[0055] [Tableaux1]

Code d'enrobage	Mode d'enrobage
1	MG puis « FAP + Sc50 »
2	MG puis « FAP + Sc50 » puis MG puis FAP
3	MG puis « FAP + Sc50 » puis FAL
4	MG puis « FAP + Sc50 » puis MG puis FAL
5	MG puis « FAP + Sc50 » puis MG sous-vide
6	MG puis « FAP + Sc50 » puis MG sous-vide puis FAP

[0056] Les croquettes ainsi enrobées de la levure sèche active Sc50 sont conditionnées dans des sachets en aluminium, puis stockées à température ambiante (20°C +/- 5°C).

[0057] Etude de la stabilité de la levure sèche active Sc50 enrobée autour des croquettes

Le marqueur de stabilité suivi pendant le stockage des croquettes enrobées est le taux de cellules de levures revivifiables (méthode normalisée NF EN 15789).

La [Fig.9] illustre les résultats de la stabilité de la levure sèche active Sc50 autour des croquettes pour chiens selon les codes d'enrobage 1 à 4.

Plus particulièrement, la [Fig.9] A illustre la stabilité de la levure sèche active Sc50 dans des croquettes qui présentent une activité à l'eau allant de 0,45 à 0,49. Le trait continu représentant la stabilité de la levure dans la croquette enrobée selon le code d'enrobage 2 tandis que le trait discontinu représente la stabilité de la levure dans la croquette enrobée selon le code d'enrobage 1.

La [Fig.9] B illustre la stabilité de la levure sèche active Sc50 dans des croquettes qui présentent une activité à l'eau allant de 0,53 à 0,58. Le trait continu représentant la stabilité de la levure dans la croquette enrobée selon le code d'enrobage 4 tandis que le trait discontinu représente la stabilité de la levure dans la croquette enrobée selon le code d'enrobage 3.

La [Fig.10] illustre les résultats de la stabilité de la levure sèche active Sc50 autour des croquettes pour chats qui présentent une activité à l'eau allant de 0,32 à 0,35. La série représentée à la [Fig.10] correspond à la moyenne des viabilités obtenues à chaque échéance pour les 4 modes d'enrobage selon les codes d'enrobage 1-2 et 5-6.

[0058] Remarques et conclusions

Il ressort des figures 9 et 10 que la levure sèche active Sc50 de l'invention présente d'excellentes performances de stabilité une fois enrobée autour de la croquette,

pouvant aller jusqu'à :

- 15 mois dans des croquettes pour chiens lorsque la couche d'enrobage ne comprend que des facteurs d'appétence poudre (codes d'enrobage 1 et 2, [Fig.9] A),
- 12 mois lorsque la couche d'enrobage comprend un facteur d'appétence liquide, spécificité de certaines croquettes pour chiens (codes d'enrobage 3 et 4, [Fig.9] B),
- 24 mois dans des croquettes pour chats quels que soient les modes d'enrobage testés (codes 1-2, 5-6, [Fig.10]).

[0059] La présente divulgation ne se limite pas aux exemples décrits ci-avant, seulement à titre d'exemple, mais elle englobe toutes les variantes que pourra envisager l'homme de l'art dans le cadre de la protection recherchée.

Référence à du matériel biologique déposé

[0060] Dans la présente demande, il est fait référence au matériel biologique suivant et aux souches variantes ou mutantes dérivées :

- référence d'identification « Sc50 » et numéro d'enregistrement « I-5660 » déposée à la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes (CNCM) (25, rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15), en France, le 03 mars 2021 par Lesaffre et Compagnie dont l'adresse est 41 rue Etienne Marcel, 75009 Paris.

Liste des documents cités

Documents brevets

[0061] À toute fin utile, les documents brevets suivants sont cités :

- patcit1 : JP2008013534 ; et
- patcit2 : PCT/US2009/056292.

Littérature non-brevet

[0062] À toute fin utile, l'élément non-brevet suivant est cité :

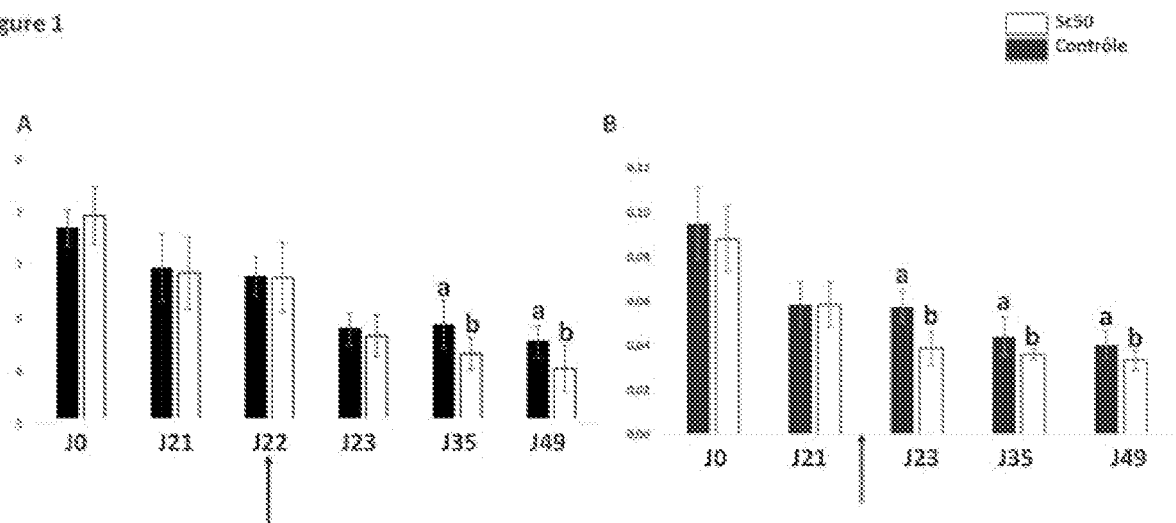
- nplcit1 : Bruna M. Rodrigues et al., Hindawi, Int. J. of Microbiology, Vol 2020, ID 1293481, 10 pages ;
- nplcit2 : Yeast Technology, 2ème édition, 1991, G. Reed et T.W. Nagodawithana, publié par Van Nostrand Reinhold, ISBN 0-442-31892-8 ;
- nplcit3 : Brito, C.B.M., Félix, A.P., Jesus, R.M., França, M.I., Oliveira, S.G., Krabbe, E.L., Maiorka, A., 2010. Digestibility and palatability of dog foods containing different moisture levels, and the inclusion of a mould inhibitor. Anim. Feed Sci. Technol. 159, 150-155 ;
- nplcit4 : Journal FEMS Microbiology Ecology, « A dysbiosis index to assess microbial changes in fecal samples of dogs with chronic inflammatory enteropathy. Al-Shawaqfeh et al., 2017. ».

Revendications

- [Revendication 1] Levure *Saccharomyces cerevisiae* obtenue par culture de la souche *Saccharomyces cerevisiae* déposée le 03 mars 2021 auprès de la CNCM sous le numéro I-5660, qui est une levure sèche active présentant les caractéristiques physico-chimiques suivantes :
- une teneur en matières sèches supérieure à 95% en poids et pouvant aller jusqu'à 97% en poids ;
 - une activité de l'eau allant de 0,1 à 0,3 ;
 - une forme de sphérule ;
 - une granulométrie caractérisée par une courbe gaussienne de distribution de la taille montrant qu'au moins 90% des sphérules présentent un diamètre allant de 0,3 à 0,7mm.
- [Revendication 2] Levure selon la revendication 1 caractérisée en ce qu'elle présente une stabilité, dans un emballage sous-vide et à une température allant de 15 à 25°C, d'au moins 24 mois, et de préférence allant de 24 à 36 mois.
- [Revendication 3] Levure selon la revendication 1 ou 2 pour son utilisation :
- dans l'amélioration du système immunitaire intestinal chez les animaux de compagnie et/ou
 - dans le rétablissement d'un microbiote intestinal normal chez les animaux de compagnie.
- [Revendication 4] Facteur d'appétence solide pour animaux de compagnie, caractérisé en ce qu'il comprend une levure selon la revendication 1 ou 2, ladite levure présentant une durée de vie allant de 12 à 24 mois au sein dudit facteur d'appétence.
- [Revendication 5] Aliment pour animaux de compagnie caractérisé en ce qu'il comprend une levure selon la revendication 1 ou 2 ou un facteur d'appétence selon la revendication 4, ladite levure présentant une durée de vie allant de 12 à 24 mois au sein dudit aliment.
- [Revendication 6] Aliment selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une croquette enrobée par au moins une couche d'enrobage, ladite couche d'enrobage comprenant une levure selon la revendication 1 ou 2 ou un facteur d'appétence selon la revendication 4.
- [Revendication 7] Aliment selon la revendication 6, caractérisé en ce que la couche d'enrobage est présente en une quantité en poids allant de 3 à 50%, et de préférence de 5 à 20 % par rapport au poids total de l'aliment.
- [Revendication 8] Aliment selon la revendication 6 ou 7, caractérisé en ce que la couche d'enrobage comprend en outre une matière grasse.

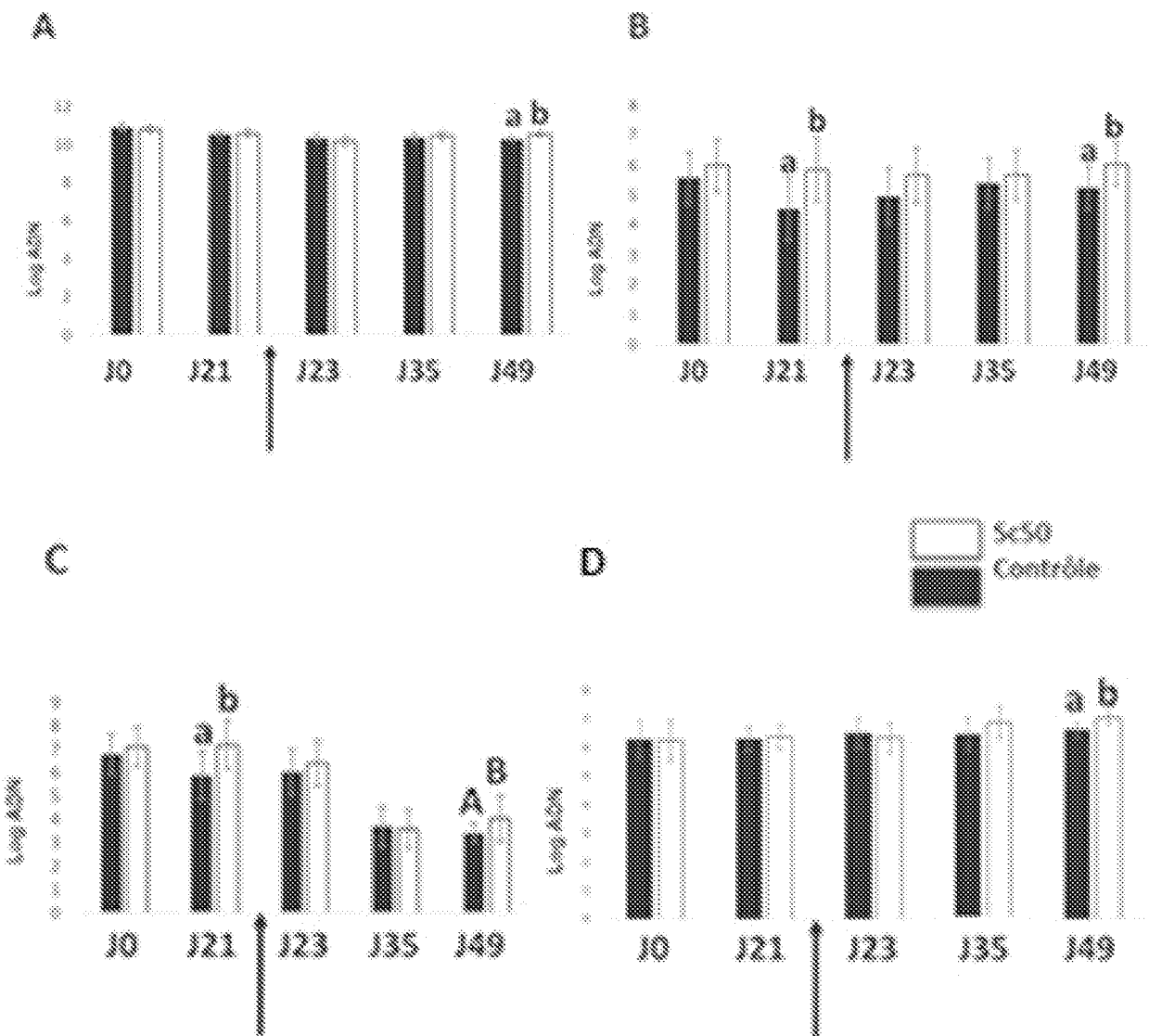
[Fig. 1]

Figure 1



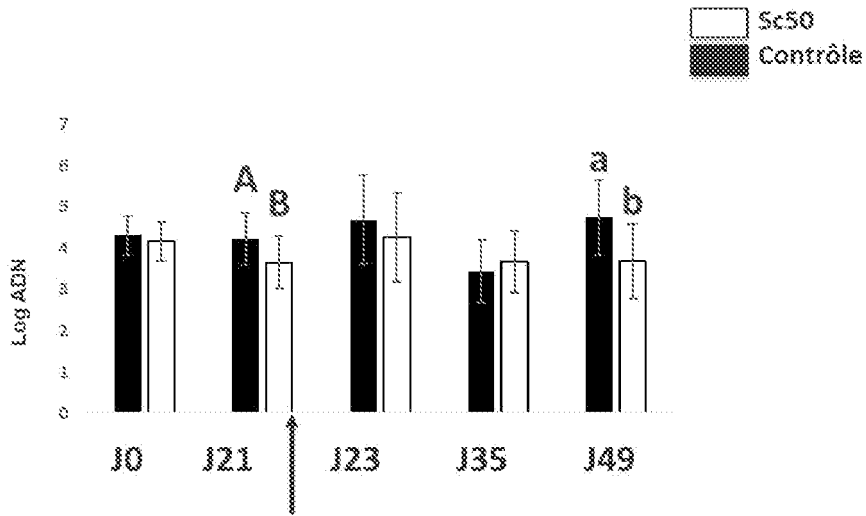
[Fig. 2]

Figure 2



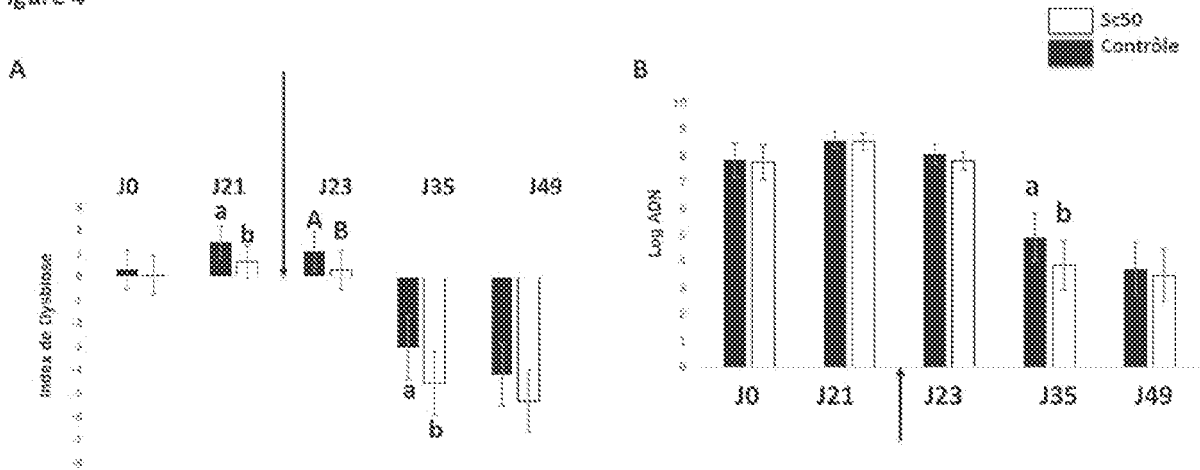
[Fig. 3]

Figure 3



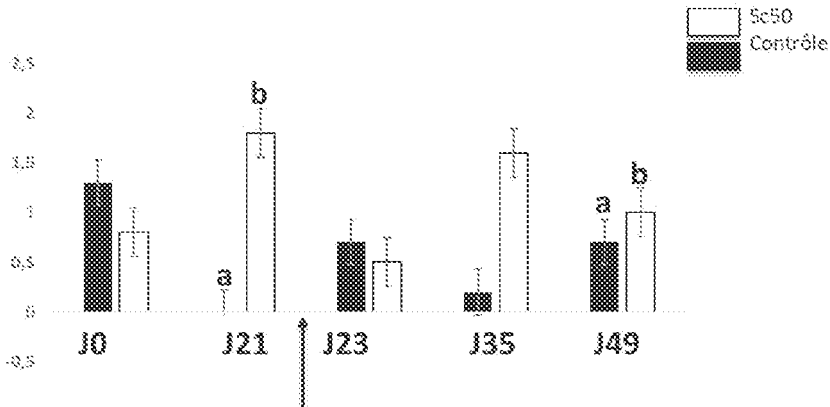
[Fig. 4]

Figure 4



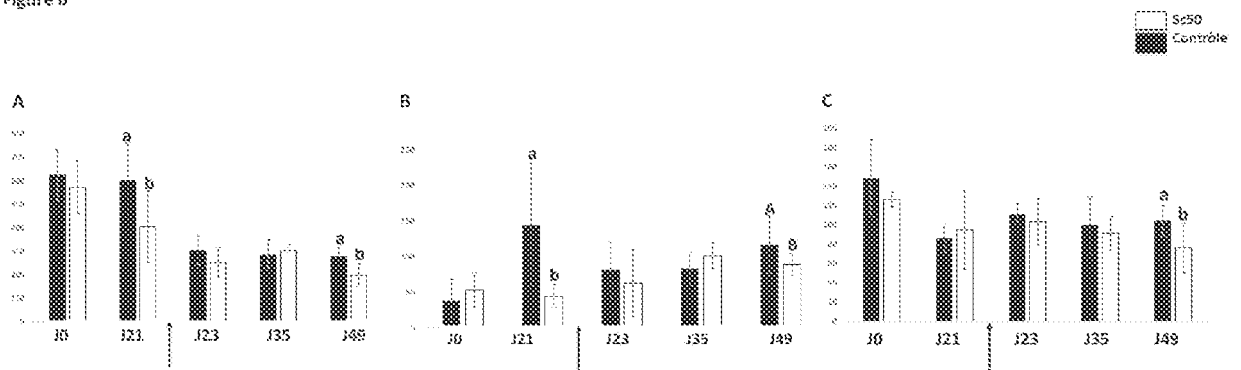
[Fig. 5]

Figure 5

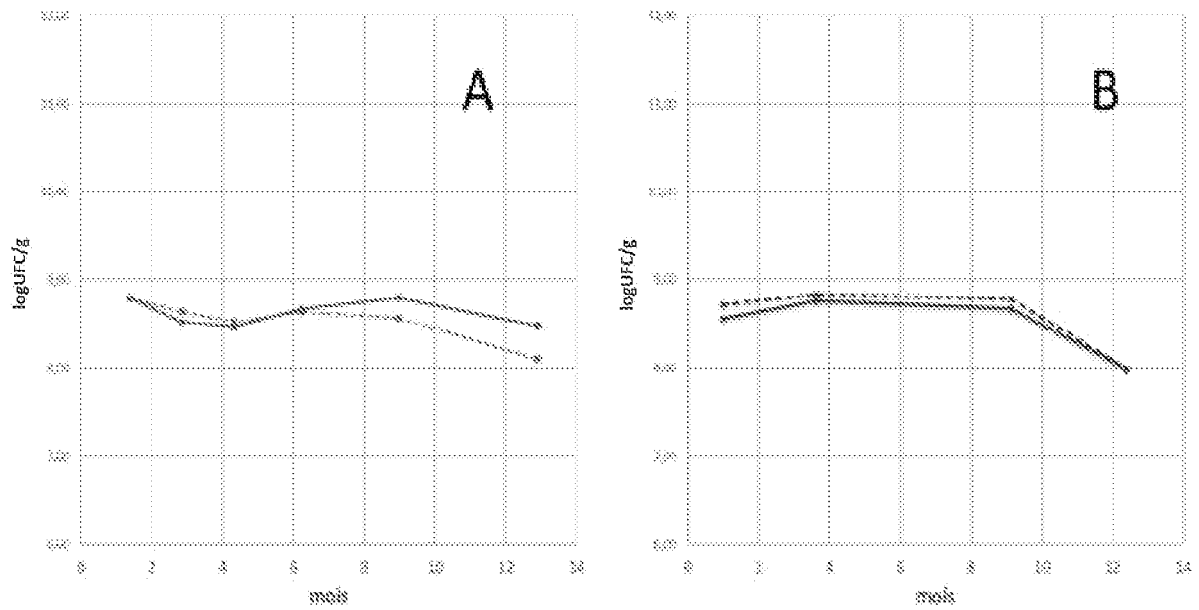


[Fig. 6]

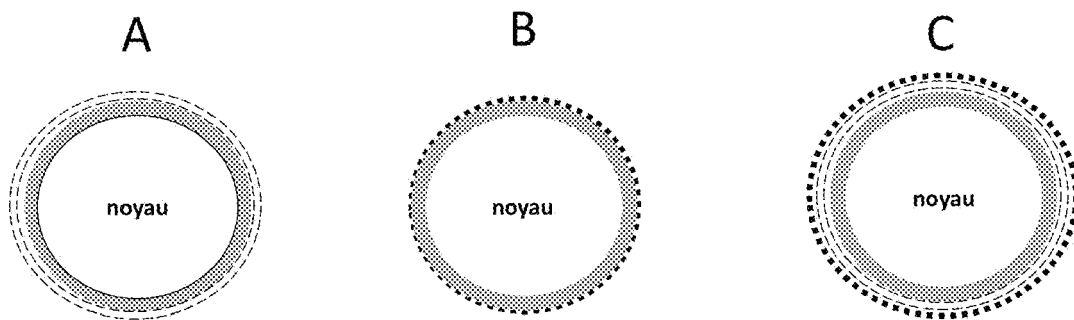
Figure 6



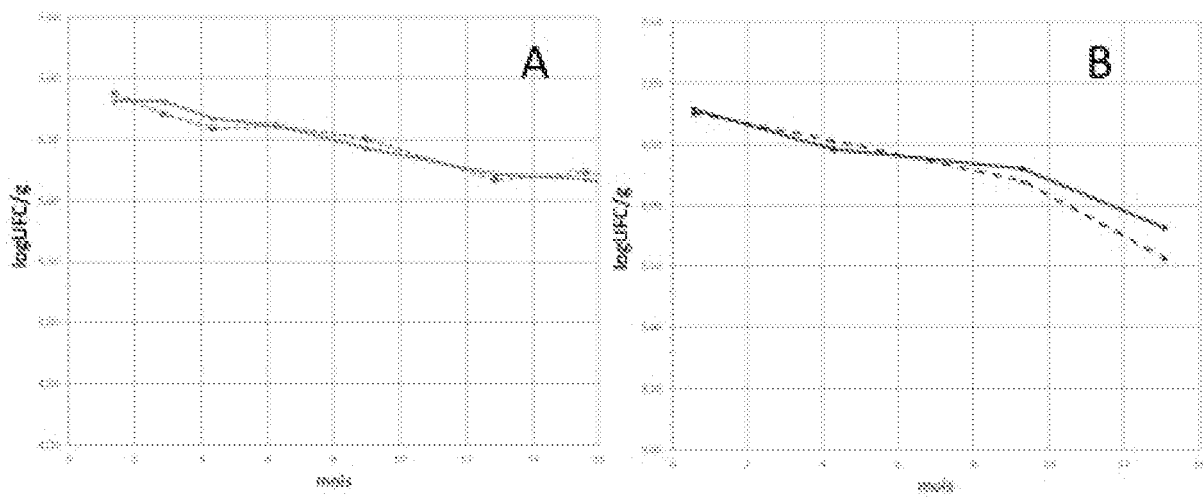
[Fig. 7]



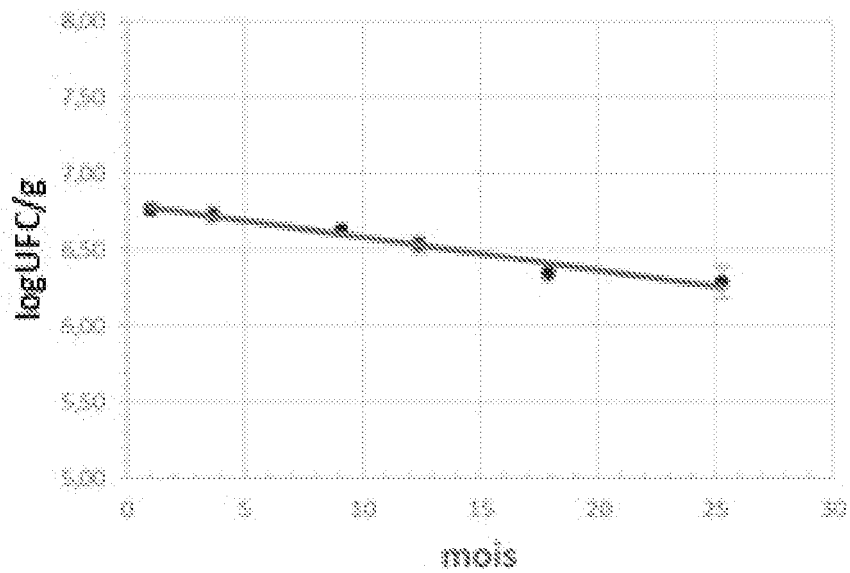
[Fig. 8]



[Fig. 9]



[Fig. 10]



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement
national

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

**FA 908701
FR 2203569**

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	WO 2010/103201 A1 (LESAFFRE & CIE [FR]; HIOLLE AMELIE [FR] ET AL.) 16 septembre 2010 (2010-09-16) * le document en entier * * en particulier : abrégé ; page 3, ligne 7 - page 7, ligne 31 ; revendications 1-10 ; exemples * -----	1-8	C12N1/18 A23K10/18 A23K50/42
X	EP 0 636 692 B1 (LESAFFRE & CIE [FR]) 9 mars 2005 (2005-03-09) * le document en entier * * en particulier : abrégé ; page 1, ligne 1 - page 2, ligne 30 ; revendications 1-17; exemples * -----	1-8	
X	EP 2 227 539 B1 (LESAFFRE & CIE [FR]; UNIVERSITÉ D'AUVERGNE CLERMONT 1 [FR] ET AL.) 9 août 2017 (2017-08-09) * le document en entier * * en particulier : abrégé ; [0012]-[0048] ; revendications 1-17 ; figures 1-26 ; exemples * -----	1-8	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
A	EP 2 099 898 B1 (DANSTAR FERMENT AG [CH]) 28 juin 2017 (2017-06-28) * le document en entier * -----	1-8	C12N C12R C11C A23K
A	FR 2 928 652 A1 (LESAFFRE ET COMPANGIE SA [FR]) 18 septembre 2009 (2009-09-18) * le document en entier * -----	1-8	
A	US 2021/219568 A1 (AUCLAIR ERIC [FR] ET AL) 22 juillet 2021 (2021-07-22) * le document en entier * -----	1-8	
A	FR 2 901 138 A1 (LESAFFRE & CIE [FR]) 23 novembre 2007 (2007-11-23) * le document en entier * -----	1-8	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
30 janvier 2023		Ferreira, Roger	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 2203569 FA 908701**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.
Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **30-01-2023**
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO 2010103201	A1	16-09-2010	BR	PI1009850 A2	25-08-2015
			CA	2753835 A1	16-09-2010
			CN	102348388 A	08-02-2012
			DK	2405767 T3	08-02-2016
			EP	2405767 A1	18-01-2012
			ES	2561633 T3	29-02-2016
			FR	2942939 A1	17-09-2010
			KR	20110134456 A	14-12-2011
			MA	33180 B1	02-04-2012
			NZ	595022 A	31-05-2013
			PL	2405767 T3	30-06-2016
			RU	2011140814 A	20-04-2013
			TN	2011000453 A1	27-03-2013
			UA	107190 C2	10-12-2014
			US	2012003317 A1	05-01-2012
			WO	2010103201 A1	16-09-2010

EP 0636692	B1	09-03-2005	AT	290588 T	15-03-2005
			DE	69434289 T2	29-12-2005
			EP	0636692 A1	01-02-1995
			ES	2239315 T3	16-09-2005
			FR	2708621 A1	10-02-1995

EP 2227539	B1	09-08-2017	AU	2008351156 A1	27-08-2009
			BR	PI0820068 A2	01-09-2015
			CA	2709850 A1	27-08-2009
			CN	101918536 A	15-12-2010
			DK	2227539 T3	13-11-2017
			EP	2227539 A2	15-09-2010
			ES	2649914 T3	16-01-2018
			HR	P20171632 T1	15-12-2017
			HU	E034628 T2	28-02-2018
			IL	206110 A	31-07-2013
			JP	5497661 B2	21-05-2014
			JP	2011509651 A	31-03-2011
			KR	20110066118 A	16-06-2011
			LT	2227539 T	27-11-2017
			MY	159379 A	30-12-2016
			NO	2227539 T3	06-01-2018
			NZ	586417 A	27-07-2012
			PL	2227539 T3	31-01-2018
			RU	2010131018 A	10-02-2012
			SI	2227539 T1	30-03-2018
TN	2010000239 A1	11-11-2011			
US	2010303778 A1	02-12-2010			
WO	2009103884 A2	27-08-2009			

EPO FORM P0465

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 2203569 FA 908701**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.
Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **30-01-2023**
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
		ZA 201003978 B	29-02-2012
EP 2099898	B1 28-06-2017	DK 2099898 T3	09-10-2017
		EP 2099898 A1	16-09-2009
		ES 2639810 T3	30-10-2017
		FR 2909685 A1	13-06-2008
		HU E034475 T2	28-02-2018
		LT 2099898 T	11-09-2017
		PL 2099898 T3	29-12-2017
		PT 2099898 T	19-09-2017
		US 2010092611 A1	15-04-2010
		US 2018044626 A1	15-02-2018
		US 2019071631 A1	07-03-2019
		US 2020172854 A1	04-06-2020
		US 2021261909 A1	26-08-2021
		WO 2008090270 A1	31-07-2008
FR 2928652	A1 18-09-2009	AUCUN	
US 2021219568	A1 22-07-2021	AR 115099 A1	25-11-2020
		AU 2019270548 A1	03-12-2020
		BR 112020023052 A2	02-02-2021
		CA 3098925 A1	21-11-2019
		CN 112153904 A	29-12-2020
		EP 3793373 A1	24-03-2021
		FR 3081090 A1	22-11-2019
		US 2021219568 A1	22-07-2021
		WO 2019220052 A1	21-11-2019
FR 2901138	A1 23-11-2007	BR PI0711839 A2	13-12-2011
		CA 2652644 A1	29-11-2007
		CN 101448510 A	03-06-2009
		EP 2026826 A2	25-02-2009
		FR 2901138 A1	23-11-2007
		JP 2009537131 A	29-10-2009
		RU 2395291 C1	27-07-2010
		UA 94941 C2	25-06-2011
		US 2009202678 A1	13-08-2009
		WO 2007135278 A2	29-11-2007

EPO FORM P0465

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82