

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

①① N° de publication :

3 085 687

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national :

18 71008

⑤① Int Cl⁸ : **C 12 N 1/04** (2018.01), A 23 K 20/10, A 61 K 35/742,
A 61 P 31/04, A 61 P 33/00, C 12 N 3/00

①②

BREVET D'INVENTION

B1

⑤④ COMPOSITION ET PROCEDE DE CONSERVATION.

②② Date de dépôt : 07.09.18.

③③ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public
de la demande : 13.03.20 Bulletin 20/11.

④⑤ Date de la mise à disposition du public du
brevet d'invention : 14.05.21 Bulletin 21/19.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche :

Se reporter à la fin du présent fascicule

⑥⑥ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

○ Demande(s) d'extension :

⑦① Demandeur(s) : *NOLIVADE Société à responsabilité
limitée* — FR.

⑦② Inventeur(s) : BRAME ALEXANDRE et THEBAULT
STEPHANE.

⑦③ Titulaire(s) : *NOLIVADE Société à responsabilité
limitée*.

⑦④ Mandataire(s) : LLR.

FR 3 085 687 - B1



Description

Titre de l'invention : Composition et procédé de conservation

- [0001] L'invention concerne une composition et un procédé de conservation de microorganismes.
- [0002] Les microorganismes sont utilisés dans divers domaines d'activité selon leurs propriétés particulières. Ainsi, certains champignons sont utilisés en brasserie pour la fermentation du houblon ou encore en fromagerie. Certaines bactéries sont utilisées en tant que ferments lactiques en agroalimentaire pour la fabrication de yaourts, d'autres produisent des toxines pouvant être utilisées en médecine. Parmi ces microorganismes, on trouve des bactéries qui ont la possibilité de sporuler, la spore étant une structure de survie sous la forme de laquelle les bactéries ont une activité réduite. Cet état offre aux bactéries une stabilité et une résistance aux agressions physiques et chimiques bien plus importante que l'état végétatif. Cependant, dès que les spores se retrouvent dans un milieu favorable (en termes d'humidité, de température, d'apports nutritifs...), elles peuvent retrouver une forme végétative par germination et perdre cette stabilité. Selon la galénique des produits bactériens, il est donc plus ou moins facile de conserver les spores. Ainsi, la forme sèche, sous la forme d'une poudre, permet une meilleure stabilité. En revanche, si une forme liquide de type solution prête à l'emploi favorise des applications via l'eau de boisson ou par pulvérisation sur un aliment par exemple, elle favorise également la germination des spores. Obtenir une solution liquide et stable de spores devient alors intéressant pour pouvoir conserver les souches bactériennes avant utilisation.
- [0003] Des exemples de conservation des spores de bactéries ont déjà été proposés dans l'art antérieur. Par exemple le brevet US 5,215,747 décrit une composition de prémélange stable au stockage contenant des endospores de *Bacillus subtilis* et au moins un composant chimique fongicide. Ces prémélanges peuvent être sous forme liquide, mais malheureusement contiennent toutefois des solvants organiques tels que le xylène ou le méthanol qui, dans certains cas, peut être toxique pour la spore.
- [0004] Aussi, est-il important de proposer des compositions de conservation des spores de bactéries, qui n'affectent pas la viabilité de celles-ci et qui n'altèrent pas leurs propriétés.
- [0005] Un des buts de l'invention est de pallier les inconvénients de l'art antérieur.
- [0006] Un autre but de l'invention est de fournir une méthode de conservation des spores de bactéries qui soit simple, rapide et économiquement peu onéreuse, mais surtout respectueuse de l'environnement.
- [0007] Encore un autre but de l'invention est de proposer des compositions qui peuvent directement être utilisées en alimentation.

- [0008] Aussi l'invention concerne un procédé de conservation de spore de bactérie, comprenant une étape de mise en contact d'au moins une spore de bactérie avec une composition liquide, ladite composition liquide étant essentiellement constituée, ou étant constituée :
- [0009] – de plus de 14% de propylène glycol, et
- [0010] – moins de 86% d'eau,
- [0011] les pourcentages étant exprimés en volume par rapport au volume total de la composition liquide, ladite composition liquide étant notamment dépourvue d'agent biocide, ou dépourvue d'agent de germination, ou dépourvue d'agent biocide et d'agent de germination.
- [0012] L'invention repose sur la constatation surprenante faite par les inventeurs que la simple utilisation de propylène glycol, éventuellement en présence d'eau, a un effet conservateur sur les spores de bactéries (concentration stable en spores viables pouvant germer), sans qu'il soit nécessaire de prendre des précautions particulières de stockage, de température ou de luminosité. En outre, le procédé selon l'invention permet de maintenir les spores de bactéries dans des conditions où elles ne germeront pas (tant qu'elles sont dans le liquide de conservation). En outre, la composition liquide susmentionnée permet de maintenir les spores dans un milieu où aucune contamination bactérienne ou fongique ne pourra se développer.
- [0013] Dans le procédé selon l'invention, la composition liquide comprend donc soit du propylène glycol seul, dans lequel se retrouve la ou les spores de bactéries, soit un mélange de propylène glycol et d'eau (ou du propylène glycol dilué dans l'eau).
- [0014] Dans un aspect avantageux, l'invention concerne un procédé de conservation de spore de bactérie, comprenant une étape de mise en contact d'au moins une spore de bactérie avec une composition liquide, ladite composition liquide comprenant, ou étant essentiellement constituée :
- [0015] – de plus de 14% de propylène glycol, et
- [0016] – moins de 86% d'eau,
- [0017] les pourcentages étant exprimés en volume par rapport au volume total de la composition liquide, ladite composition liquide étant dépourvue d'agent biocide, ou dépourvue d'agent de germination, ou dépourvue d'agent biocide et d'agent de germination. Dans cet aspect, la composition liquide peut contenir d'autres composés, tel que des sels, des minéraux, ou tout autre composé n'ayant aucun effet intrinsèque conservateur des spores de bactéries.
- [0018] La composition liquide susmentionnée contient du propylène glycol (PG) également appelé propane-1,2-diol, 1,2-dihydroxypropane, méthyl glycol, alpha-propylène-glycol, 1,2-propanediol, dl-propylène-glycol. Il s'agit d'un diol à l'état liquide utilisé dans de nombreux usages industriels et pharmaceutiques ou agropharma-

ceutiques (solvant de pesticides). Le propylène glycol peut également, à faible dose, être utilisé comme additif alimentaire. Il est issu de la carbochimie, et généralement de la pétrochimie. Le propylène-glycol est obtenu à partir de la réaction de l'oxyde de propylène avec l'eau pour former du monopropylène glycol (PG) et est identifié par son numéro CAS : 57-55-6.

[0019] Dans le procédé selon l'invention, la composition comprend plus de 14% en volume de polypropylène glycol. Cela signifie que la composition contient de 14% à 100% de propylène glycol, la valeur de 14% en volume de propylène glycol étant exclue. En effet, comme cela est démontré dans les exemples, les inventeurs ont démontré qu'une composition constituée de 86% d'eau et de 14% de propylène glycol ne permettait pas de limiter la prolifération de bactéries ou de champignons, et donc ne remplissait pas l'un des critères de la composition liquide telle que décrite ci-dessus.

[0020] Comme la composition liquide susmentionnée comprend plus de 14% de propylène glycol en volume, le complément consiste en de l'eau. Aussi, le tableau suivant résume-t-il les différentes compositions liquides possibles.

[0021]

[Tableaux1]

	Propylène glycol	Eau
Sol #9	14,5%	85,5%
Sol #10	15%	85%
Sol #11	15,5%	84,5%
Sol #12	16%	84%
Sol #13	16,5%	83,5%
Sol #14	17%	83%
Sol #15	17,5%	82,5%
Sol #16	18%	82%
Sol #17	18,5%	81,5%
Sol #18	19%	81%
Sol #19	19,5%	80,5%
Sol #20	20%	80%
Sol #21	20,5%	79,5%
Sol #22	21%	79%
Sol #23	21,5%	78,5%
Sol #24	22%	78%
Sol #25	22,5%	77,5%
Sol #26	23%	77%
Sol #27	23,5%	76,5%
Sol #28	24%	76%
Sol #29	24,5%	75,5%
Sol #30	25%	75%
Sol #31	25,5%	74,5%
Sol #32	26%	74%
Sol #33	26,5%	73,5%
Sol #34	27%	73%
Sol #35	27,5%	72,5%
Sol #36	28%	72%

Sol #37	28,5%	71,5%
Sol #38	29%	71%
Sol #39	29,5%	70,5%
Sol #40	30%	70%
Sol #41	30,5%	69,5%
Sol #42	31%	69%
Sol #43	31,5%	68,5%
Sol #44	32%	68%
Sol #45	32,5%	67,5%
Sol #46	33%	67%
Sol #47	33,5%	66,5%
Sol #48	34%	66%
Sol #49	34,5%	65,5%
Sol #50	35%	65%
Sol #51	35,5%	64,5%
Sol #52	36%	64%
Sol #53	36,5%	63,5%
Sol #54	37%	63%
Sol #55	37,5%	62,5%
Sol #56	38%	62%
Sol #57	38,5%	61,5%
Sol #58	39%	61%
Sol #59	39,5%	60,5%
Sol #60	40%	60%
Sol #61	40,5%	59,5%
Sol #62	41%	59%
Sol #63	41,5%	58,5%
Sol #64	42%	58%
Sol #65	42,5%	57,5%
Sol #66	43%	57%
Sol #67	43,5%	56,5%

Sol #68	44%	56%
Sol #69	44,5%	55,5%
Sol #70	45%	55%
Sol #71	45,5%	54,5%
Sol #72	46%	54%
Sol #73	46,5%	53,5%
Sol #74	47%	53%
Sol #75	47,5%	52,5%
Sol #76	48%	52%
Sol #77	48,5%	51,5%
Sol #78	49%	51%
Sol #79	49,5%	50,5%
Sol #80	50%	50%
Sol #81	50,5%	49,5%
Sol #82	51%	49%
Sol #83	51,5%	48,5%
Sol #84	52%	48%
Sol #85	52,5%	47,5%
Sol #86	53%	47%
Sol #87	53,5%	46,5%
Sol #88	54%	46%
Sol #89	54,5%	45,5%
Sol #90	55%	45%
Sol #91	55,5%	44,5%
Sol #92	56%	44%
Sol #93	56,5%	43,5%
Sol #94	57%	43%
Sol #95	57,5%	42,5%
Sol #96	58%	42%
Sol #97	58,5%	41,5%
Sol #98	59%	41%

Sol #99	59,5%	40,5%
Sol #100	60%	40%
Sol #101	60,5%	39,5%
Sol #102	61%	39%
Sol #103	61,5%	38,5%
Sol #104	62%	38%
Sol #105	62,5%	37,5%
Sol #106	63%	37%
Sol #107	63,5%	36,5%
Sol #108	64%	36%
Sol #109	64,5%	35,5%
Sol #110	65%	35%
Sol #111	65,5%	34,5%
Sol #112	66%	34%
Sol #113	66,5%	33,5%
Sol #114	67%	33%
Sol #115	67,5%	32,5%
Sol #116	68%	32%
Sol #117	68,5%	31,5%
Sol #118	69%	31%
Sol #119	69,5%	30,5%
Sol #120	70%	30%
Sol #121	70,5%	29,5%
Sol #122	71%	29%
Sol #123	71,5%	28,5%
Sol #124	72%	28%
Sol #125	72,5%	27,5%
Sol #126	73%	27%
Sol #127	73,5%	26,5%
Sol #128	74%	26%
Sol #129	74,5%	25,5%

Sol #130	75%	25%
Sol #131	75,5%	24,5%
Sol #132	76%	24%
Sol #133	76,5%	23,5%
Sol #134	77%	23%
Sol #135	77,5%	22,5%
Sol #136	78%	22%
Sol #137	78,5%	21,5%
Sol #138	79%	21%
Sol #139	79,5%	20,5%
Sol #140	80%	20%
Sol #141	80,5%	19,5%
Sol #142	81%	19%
Sol #143	81,5%	18,5%
Sol #144	82%	18%
Sol #145	82,5%	17,5%
Sol #146	83%	17%
Sol #147	83,5%	16,5%
Sol #148	84%	16%
Sol #149	84,5%	15,5%
Sol #150	85%	15%
Sol #151	85,5%	14,5%
Sol #152	86%	14%
Sol #153	86,5%	13,5%
Sol #154	87%	13%
Sol #155	87,5%	12,5%
Sol #156	88%	12%
Sol #157	88,5%	11,5%
Sol #158	89%	11%
Sol #159	89,5%	10,5%
Sol #160	90%	10%

Sol #161	90,5%	9,5%
Sol #162	91%	9%
Sol #163	91,5%	8,5%
Sol #164	92%	8%
Sol #165	92,5%	7,5%
Sol #166	93%	7%
Sol #167	93,5%	6,5%
Sol #168	94%	6%
Sol #169	94,5%	5,5%
Sol #170	95%	5%
Sol #171	95,5%	4,5%
Sol #172	96%	4%
Sol #173	96,5%	3,5%
Sol #174	97%	3%
Sol #175	97,5%	2,5%
Sol #176	98%	2%
Sol #177	98,5%	1,5%
Sol #178	99%	1%
Sol #179	99,5%	0,5%
Sol #180	100%	0%

[0022] Le procédé selon l'invention est donc adapté à la conservation des spores de bactéries, c'est-à-dire des spores de bactéries capables de sporulation.

[0023] Une spore est une cellule ou plus rarement une formation pluricellulaire reproductive qui constitue une des étapes du cycle de vie de nombreuses bactéries, plantes, algues, champignons, voire de certains protozoaires.

[0024] Les spores (mitospores ou méiospores) donnent naissance par mitoses à un nouvel individu sans fécondation, ce qui les distingue des gamètes. Certaines spores, notamment celles de bactéries ou de champignons, présentent des caractéristiques remarquables de résistance : elles peuvent survivre pendant plusieurs milliers d'années, même dans des conditions défavorables, et permettre ainsi la dispersion de l'espèce, parfois à une grande distance de son point d'origine, ou longtemps après la disparition du « parent ».

[0025] Lorsque les conditions redeviennent favorables, la spore, qui est la forme de ré-

sistance de la bactérie, peut redonner une forme végétative : c'est la germination.

[0026] Les spores sont sensibles aux produits sporicides.

[0027] Concernant les spores de bactéries, seuls trois genres bactériens sont capables de sporuler : le genre *Bacillus* (bactéries aérobies à bacilles Gram +), le genre *Clostridium* (bactéries anaérobies à bacilles Gram +), et le genre *Sporosarcina* (bactéries non pathogènes, présentes dans les sols).

[0028] Aussi, dans l'invention, les spores de bactéries sont des spores de *Bacillus*, des spores de *Clostridium* ou des spores de *Sporosarcina*. Les bactéries les plus avantageuses, pour lesquelles la conservation des spores est recherchée sont les spores de *Bacillus*.

[0029] En particulier, il est avantageux de conserver les spores de bactéries du genre *Bacillus* notamment des espèces *Bacillus agri*, *Bacillus aizawai*, *Bacillus albolactis*, *Bacillus altitudinis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus butanolivorans*, *Bacillus cereus*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus endoparasiticus*, *Bacillus endorhythmos*, *Bacillus firmus*, *Bacillus flexus*, *Bacillus fusiformis*, *Bacillus kurstaki*, *Bacillus lacticola*, *Bacillus lactimorbus*, *Bacillus lactis*, *Bacillus laterosporus*, *Bacillus lentimorbus*, *Bacillus lentus*, *Bacilluslicheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus medusa*, *Bacillus metiens*, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus natto*, *Bacillus nigrificans*, *Bacillus popillae*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus siamensis*, *Bacillus simplex*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus spp.*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus smithii*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus unifagellatus*, *Bacillus vallismortis*, *Geobacillus stearothermophilus*..

[0030] Il est d'autant plus avantageux de conserver les spores de bactéries des espèces *Bacillus subtilis*, *Bacilluslicheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus flexus*, *Bacillus fusiformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus smithii*, *Bacillus vallismortis*, *Geobacillus stearothermophilus*.

[0031] Comme expliqué plus haut, il est important que la composition liquide soit dépourvue de tous composés sporicides, sans quoi la conservation ne sera pas possible puisque les spores seront détruites.

[0032] La composition liquide doit en outre être dépourvue de composés biocides. Par composé biocide, conformément au Règlement européen n° 528/2012, on entend dans l'invention toute substance ou tout mélange, constitué d'une ou plusieurs substances actives, en contenant ou en générant, qui est destiné à détruire, repousser ou rendre inoffensifs les organismes nuisibles, à en prévenir l'action ou à les combattre de toute autre manière par une action autre qu'une simple action physique ou mécanique. Dans cette définition, on entend par « substance active », toute substance ou tout microorganisme qui exerce une action sur ou contre les organismes nuisibles ;

et par « microorganisme », toute entité microbiologique, cellulaire ou non cellulaire, capable de se répliquer ou de transférer du matériel génétique, y compris les champignons inférieurs, les virus, les bactéries, les levures, les moisissures, les algues, les protozoaires et les helminthes parasites microscopiques. Notamment, la composition liquide ne contient pas de Proxel GXL un agent biocide disponible chez Arch Chemical of Norwalk, Connecticut USA.

- [0033] La composition liquide doit en outre être dépourvue de composés tels que des agents de germination. Par agent de germination, on entend dans l'invention toute substance ou tout mélange, constitué d'une ou plusieurs substances actives, en contenant ou en générant qui a la propriété de favoriser la germination des spores. Notamment, la composition liquide ne contient aucun des agents de germination suivants ou aucun de leurs mélanges : un acide aminé dont la L-alanine, la L-arginine, la L-aspartate, la L-glutamate, la L-histidine, la L-isoleucine, la L-lysine, la L-méthionine, la L-serine, la L-tryptophan, la L-tyrosine, la L-valine, la L-proline, la L-leucine, la L-cystéine, la L-thréonine, la L-glutamine, la L-asparagine, la L-phénylalanine, et tous leurs dérivés, , une purine nucléoside dont l'inosine et l'adénosine, un lactate, un acide carboxylique, un riboside...
- [0034] Avantagement, l'invention concerne le procédé susmentionné, où ledit propylène glycol représente de 15% à 40 % en volume par rapport au volume total de la composition liquide, notamment de 20 à 30% en volume par rapport au volume total de la composition liquide.
- [0035] En référence au tableau 1 ci-dessus, le procédé dans cet aspect avantageux peut comprendre l'une quelconque des solutions Sol#10 à Sol#60, et encore plus avantageusement l'une quelconque des solutions Sol#20 à Sol#40 susmentionnées.
- [0036] En d'autres termes, l'invention concerne avantagement un procédé de conservation de spore de bactérie, notamment de *Bacillus*, comprenant une étape de mise en contact d'au moins une spore de bactérie avec une composition liquide, ladite composition liquide étant essentiellement constituée, ou étant constituée :
- [0037] – de 15% à 40% de propylène glycol, et
- [0038] – de 60% à 85% d'eau,
- [0039] les pourcentages étant exprimés en volume par rapport au volume total de la composition liquide, ladite composition liquide étant notamment dépourvue d'agent biocide, ou dépourvue d'agent de germination, ou dépourvue d'agent biocide et d'agent de germination.
- [0040] Encore plus avantagement, l'invention concerne un procédé de conservation de spore de bactérie, notamment de *Bacillus*, comprenant une étape de mise en contact d'au moins une spore de bactérie avec une composition liquide, ladite composition liquide étant essentiellement constituée, ou étant constituée :

- [0041] – de 20% à 30% de propylène glycol, et
- [0042] – de 70% à 80% d'eau,
- [0043] les pourcentages étant exprimés en volume par rapport au volume total de la composition liquide, ladite composition liquide étant notamment dépourvue d'agent biocide, ou dépourvue d'agent de germination, ou dépourvue d'agent biocide et d'agent de germination.
- [0044] Dans un mode de réalisation avantageux, l'invention concerne le procédé susmentionné, comprenant en outre une étape de maintien à température ambiante de ladite au moins une spore en contact avec ladite composition liquide.
- [0045] Le procédé selon l'invention permet donc de conserver dans un état sporulé une spore de bactérie, notamment de *Bacillus*, dans des conditions de température, de pression et de luminosité non contraignantes. Aussi, une spore de bactérie, notamment de *Bacillus*, peut être conservée pendant plusieurs mois, voire plusieurs années, à une pression atmosphérique variant de la pression au niveau de la mer à une pression réduite en altitude, à des températures variant de 4°C à 40°C, notamment de 10°C à 30°C, et sans particulièrement faire attention à l'exposition à la lumière, notamment la lumière du soleil, en particulier la lumière directe du soleil.
- [0046] En d'autres termes, l'invention concerne avantageusement un procédé de conservation de spore de bactérie, notamment de *Bacillus*, comprenant
- [0047] une étape de mise en contact d'au moins une spore de bactérie avec une composition liquide, ladite composition liquide étant essentiellement constituée, ou étant constituée :
- [0048] – de plus de 14% de propylène glycol, et
- [0049] – de moins de 86% d'eau,
- [0050] les pourcentages étant exprimés en volume par rapport au volume total de la composition liquide, et
- [0051] une étape de maintien à température ambiante de ladite au moins une spore en contact avec ladite composition liquide,
- [0052] ladite composition liquide étant notamment dépourvue d'agent biocide, ou dépourvue d'agent de germination, ou dépourvue d'agent biocide et d'agent de germination.
- [0053] En d'autres termes, l'invention concerne avantageusement un procédé de conservation de spore de bactérie, notamment de *Bacillus*, comprenant
- [0054] une étape de mise en contact d'au moins une spore de bactérie avec une composition liquide, ladite composition liquide étant essentiellement constituée, ou étant constituée :
- [0055] – de 15% à 40% de propylène glycol, et
- [0056] – de 60% à 85% d'eau,
- [0057] les pourcentages étant exprimés en volume par rapport au volume total de la com-

- position liquide,
- [0058] une étape de maintien à température ambiante de ladite au moins une spore en contact avec ladite composition liquide,
- [0059] ladite composition liquide étant notamment dépourvue d'agent biocide, ou dépourvue d'agent de germination, ou dépourvue d'agent biocide et d'agent de germination.
- [0060] Encore plus avantageusement, l'invention concerne un procédé de conservation de spore de bactérie, notamment de *Bacillus*, comprenant
- [0061] une étape de mise en contact d'au moins une spore de bactérie avec une composition liquide, ladite composition liquide étant essentiellement constituée, ou étant constituée :
- [0062] – de 20% à 30% de propylène glycol, et
- [0063] – de 70% à 80% d'eau,
- [0064] les pourcentages étant exprimés en volume par rapport au volume total de la composition liquide,
- [0065] une étape de maintien à température ambiante de ladite au moins une spore en contact avec ladite composition liquide,
- [0066] ladite composition liquide étant dépourvue d'agent biocide, ou dépourvue d'agent de germination, ou dépourvue d'agent biocide et d'agent de germination.
- [0067] Dans un autre aspect avantageux, l'invention concerne le procédé susmentionné, comprenant une étape de mise en contact d'au moins une spore jusqu'à 10^{14} spores de bactéries par mL de composition totale, avec une composition liquide, ladite composition liquide étant essentiellement constituée, ou étant constituée :
- [0068] – de plus de 14% de propylène glycol, et
- [0069] – moins de 86% d'eau,
- [0070] les pourcentages étant exprimés en volume par rapport au volume total de la composition liquide.
- [0071] Dans l'invention, on entend par « d'au moins une spore à 10^{14} spores par mL », une quantité de spores de bactéries variant de 1 spore dans la composition totale jusqu'à 10^{14} spores dans un mL de la composition totale, et en particulier 1 spores, une spore par mL, $1 \cdot 10^1$ spores par mL, $5 \cdot 10^1$ spores par mL, $1 \cdot 10^2$ spores par mL, $5 \cdot 10^2$ spores par mL, $1 \cdot 10^3$ spores par mL, $5 \cdot 10^3$ spores par mL, $1 \cdot 10^4$ spores par mL, $5 \cdot 10^4$ spores par mL, $1 \cdot 10^5$ spores par mL, $5 \cdot 10^5$ spores par mL, $1 \cdot 10^6$ spores par mL, $5 \cdot 10^6$ spores par mL, $1 \cdot 10^7$ spores par mL, $5 \cdot 10^7$ spores par mL, $1 \cdot 10^8$ spores par mL, $5 \cdot 10^8$ spores par mL, $1 \cdot 10^9$ spores par mL, $5 \cdot 10^9$ spores par mL, $1 \cdot 10^{10}$ spores par mL, $5 \cdot 10^{10}$ spores par mL, $1 \cdot 10^{11}$ spores par mL, $5 \cdot 10^{11}$ spores par mL, $1 \cdot 10^{12}$ spores par mL, $5 \cdot 10^{12}$ spores par mL, $1 \cdot 10^{13}$ spores par mL, $5 \cdot 10^{13}$ et $1 \cdot 10^{14}$ spores par mL.
- [0072] En d'autres termes, l'invention concerne avantageusement un procédé de conservation de spore de bactérie, notamment de *Bacillus*, comprenant

- [0073] une étape de mise en contact d'au moins une spore à 10^{14} spores de bactéries par mL de la composition totale avec une composition liquide, ladite composition liquide étant essentiellement constituée, ou étant constituée :
- [0074] – de plus de 14% de propylène glycol, et
- [0075] – de moins de 86% d'eau,
- [0076] les pourcentages étant exprimés en volume par rapport au volume total de la composition liquide, et possiblement
- [0077] une étape de maintien à température ambiante de ladite au moins une spore en contact avec ladite composition liquide,
- [0078] ladite composition liquide étant notamment dépourvue d'agent biocide, ou dépourvue d'agent de germination, ou dépourvue d'agent biocide et d'agent de germination.
- [0079] En d'autres termes, l'invention concerne avantageusement un procédé de conservation de spore de bactérie, notamment de *Bacillus*, comprenant
- [0080] une étape de mise en contact d'au moins une spore à 10^{14} spores de bactéries par mL de la composition totale avec une composition liquide, ladite composition liquide étant essentiellement constituée, ou étant constituée :
- [0081] – de 15% à 40% de propylène glycol, et
- [0082] – de 60% à 85% d'eau,
- [0083] les pourcentages étant exprimés en volume par rapport au volume total de la composition liquide, et possiblement
- [0084] une étape de maintien à température ambiante de ladite au moins une spore en contact avec ladite composition liquide,
- [0085] ladite composition liquide étant notamment dépourvue d'agent biocide, ou dépourvue d'agent de germination, ou dépourvue d'agent biocide et d'agent de germination.
- [0086] Encore plus avantageusement, l'invention concerne un procédé de conservation de spore de bactérie, notamment de *Bacillus*, comprenant
- [0087] une étape de mise en contact d'au moins une spore à 10^{14} spores de bactéries par mL de la composition totale avec une composition liquide, ladite composition liquide étant essentiellement constituée, ou étant constituée :
- [0088] – de 20% à 30% de propylène glycol, et
- [0089] – de 70% à 80% d'eau,
- [0090] les pourcentages étant exprimés en volume par rapport au volume total de la composition liquide, et possiblement
- [0091] une étape de maintien à température ambiante de ladite au moins une spore en contact avec ladite composition liquide,
- [0092] ladite composition liquide étant notamment dépourvue d'agent biocide, ou dépourvue d'agent de germination, ou dépourvue d'agent biocide et d'agent de germination.
- [0093] Dans un autre aspect, l'invention concerne l'utilisation d'une composition liquide

pour la conservation à l'abri de contaminations fongique et bactérienne, à température ambiante, d'au moins une spore de bactérie,

- [0094] ladite composition liquide, telle que définie ci-dessus, étant essentiellement constituée, ou étant constituée :
- [0095] – de plus de 14% de propylène glycol, et
- [0096] – moins de 86% d'eau,
- [0097] les pourcentages étant exprimés en volume par rapport au volume total de la composition liquide, ladite composition liquide étant notamment dépourvue d'agent biocide, ou dépourvue d'agent de germination, ou dépourvue d'agent biocide et d'agent de germination.
- [0098] Avantageusement, l'invention concerne l'utilisation susmentionnée d'une composition liquide, ladite composition liquide étant essentiellement constituée, ou étant constituée :
- [0099] – de 15% à 40% de propylène glycol, et
- [0100] – de 60% à 85% d'eau,
- [0101] les pourcentages étant exprimés en volume par rapport au volume total de la composition liquide.
- [0102] Encore plus avantageusement, l'invention concerne l'utilisation susmentionnée, d'une composition liquide, ladite composition liquide étant essentiellement constituée, ou étant constituée :
- [0103] – de 20% à 30% de propylène glycol, et
- [0104] – de 70% à 80% d'eau,
- [0105] les pourcentages étant exprimés en volume par rapport au volume total de la composition liquide.
- [0106] L'invention concerne avantageusement l'utilisation susmentionnée, pour la conservation d'au moins une spore à 10^{14} spores de bactéries par mL de composition totale, telle que définie ci-dessus.
- [0107] L'invention concerne en outre un additif, notamment alimentaire, comprenant au moins une spore de bactérie et une composition liquide, ladite au moins une spore de bactérie étant dispersée dans ladite composition liquide,
- [0108] ladite composition liquide étant essentiellement constituée, ou étant constituée :
- [0109] – de plus de 14% de propylène glycol, et
- [0110] – moins de 86% d'eau,
- [0111] les pourcentages étant exprimés en volume par rapport au volume total de la composition liquide,
- [0112] ladite composition liquide étant notamment dépourvue d'agent biocide, ou dépourvue d'agent de germination, ou dépourvue d'agent biocide et d'agent de germination.
- [0113] Un des aspects de l'invention concerne donc un additif qui peut être associé à un

aliment, une composition alimentaire ou à une boisson, de sorte que ladite au moins une spore de bactérie soit consommable directement avec l'aliment ou via l'eau de boisson.

- [0114] Par additif alimentaire, on entend toute substance qui n'est pas normalement consommée en tant que denrée alimentaire, ni utilisée normalement comme ingrédient caractéristique d'une denrée alimentaire, qu'elle ait ou non une valeur nutritive, et dont l'addition intentionnelle à une denrée alimentaire dans un but technologique (y compris organoleptique) à une étape quelconque de la fabrication, de la transformation, de la préparation, du traitement, du conditionnement, de l'emballage, du transport ou de l'entreposage de ladite denrée entraîne, ou peut, selon toute vraisemblance, entraîner (directement ou indirectement) son incorporation ou celle de ses dérivés dans cette denrée ou en affecter d'une autre façon les caractéristiques. Cette expression ne s'applique ni aux contaminants, ni aux substances ajoutées aux denrées alimentaires pour en préserver ou en améliorer les propriétés nutritionnelles.
- [0115] L'additif selon l'invention sera utilisé dans des quantités déterminées par l'homme du métier selon les principes usuels en nutrition animale, et tenant compte des limites technologiques et des propriétés recherchées dudit additif.
- [0116] A titre d'exemple, il est avantageux de donner de l'additif susmentionné aux porcs, dans leur alimentation ou leur eau de boisson, de sorte qu'ils ingèrent l'équivalent de 25 mL dudit additif (contenant environ $3 \cdot 10^{11}$ spores par mL) par jour.
- [0117] Les aliments envisagés sont des aliments solides en granulé, fourrage, poudre, semoulette avec lesquels ledit additif pourra être mélangé ou sur lesquels ledit additif pourra être pulvérisé. Ledit additif pourra également être ajouté à des aliments liquides, des aliments en soupe ou encore à des boissons, dont notamment de l'eau de boisson.
- [0118] La spore pourra germer quand elle retrouvera des conditions favorables donc notamment lorsqu'elle ne sera plus dans sa solution de conservation, et notamment lorsque le propylène glycol sera à une concentration inférieure ou égale à 14% en volume par rapport au poids de l'additif mélangé dans un aliment ou dispersé sur un aliment, ou encore inférieure ou égale à 14% en volume par rapport au volume total d'une boisson dans laquelle est dilué ledit additif. Ces conditions seront notamment observées après ingestion de l'aliment, après mélange dans certains aliments humides comme des soupes, ou après dilution dans des boissons, notamment dans de l'eau de boisson.
- [0119] Avantagusement, l'invention concerne l'additif susmentionné, où ledit propylène glycol représente de 15% à 40 % en volume par rapport au volume total de ladite composition liquide, notamment de 20 à 30% en volume par rapport au volume total de ladite composition liquide.
- [0120] En d'autres termes, avantagusement l'invention concerne l'additif susmentionné, où

ladite composition liquide est essentiellement constituée, ou est constituée :

- [0121] – de 15% à 40% de propylène glycol, et
- [0122] – de 60% à 85% d'eau,
- [0123] les pourcentages étant exprimés en volume par rapport au volume total de la composition liquide,
- [0124] ladite composition liquide étant notamment dépourvue d'agent biocide et ou d'agent de germination.
- [0125] Avantageusement l'invention concerne l'additif susmentionné, où ladite composition liquide est essentiellement constituée, ou est constituée :
- [0126] – de 20% à 30% de propylène glycol, et
- [0127] – de 70% à 80% d'eau,
- [0128] les pourcentages étant exprimés en volume par rapport au volume total de la composition liquide,
- [0129] ladite composition liquide étant notamment dépourvue d'agent biocide et ou d'agent de germination.
- [0130] Un autre aspect de l'invention concerne un additif tel que mentionné précédemment, pour une utilisation dans le cadre de la prophylaxie des infections virales et bactériennes des animaux d'élevage.
- [0131] Les pathologies ou infections virales qui peuvent être prévenues par l'utilisation de l'additif selon l'invention sont les suivantes : les pathologies digestives notamment les diarrhées, les entérites, la salmonellose, la collibacilose, l'iléite ; les infections respiratoires et en particulier la rhinite, la pasteurellose, la bordetellose ; les infections cutanées et en particulier les ulcères, les épidermites, les nécroses ; et les infections au niveau du système locomoteur notamment les boiteries infectieuses, et les arthrites.
- [0132] Par l'utilisation de l'additif, notamment associé à un ou plusieurs aliments, ou à une boisson, permet donc d'utiliser des spores de bactéries qui ont été conservées à long terme dans des conditions très simples, et dont l'efficacité sera la même ou très proche de l'efficacité de spores fraîches, c'est-à-dire obtenues dans un délai très courts (quelques heures à quelques jours) après la sporulation des bactéries.
- [0133] Un tel additif est utilisable pour les animaux d'élevages notamment les oiseaux et les volailles, les bovins, les ovins, les porcins, les crustacés, les poissons et les mollusques ainsi que les animaux de compagnie, y compris les nouveaux animaux de compagnie.
- [0134] Encore un autre aspect de l'invention concerne un produit liquide constitué essentiellement de, ou constitué de
- [0135] au moins une spore de bactérie, et
- [0136] une composition liquide, ladite composition liquide étant essentiellement constituée, ou étant constituée :
- [0137] – de plus de 14% de propylène glycol, et

- [0138] – moins de 86% d'eau,
- [0139] les pourcentages étant exprimés en volume par rapport au volume total de la composition liquide,
- [0140] ladite composition liquide étant notamment dépourvue d'agent biocide, ou dépourvue d'agent de germination, ou dépourvue d'agent biocide et d'agent de germination.
- [0141] Le produit liquide selon l'invention comprend comme éléments essentiels, pour conférer ses propriétés de conservation des spores, au moins une spore et la composition liquide.
- [0142] Le produit liquide peut en outre contenir des sels, des adjuvants, des surfactants ou tout autre composé visant à compléter le produit, mais ces composés n'ont aucun effet sur la conservation des spores.
- [0143] Par contre comme mentionné ci-dessus, le produit liquide est dépourvu d'agents biocides, tels qu'ils ont été définis ci-dessus, ou encore d'agent de germination, tels qu'ils ont été définis ci-dessus.
- [0144] Notamment, dans le cadre du produit liquide susmentionné, ladite composition liquide est constituée essentiellement de, ou constituée de
- [0145] – de 15% à 40% de propylène glycol, et
- [0146] – de 60% à 85% d'eau,
- [0147] et en particulier,
- [0148] – de 20% à 30% de propylène glycol, et
- [0149] – de 70% à 80% d'eau.
- [0150] L'invention sera détaillée dans les exemples qui suivent.

EXEMPLES

- [0151] **INGREDIENTS et CONCENTRATIONS TESTES pour tous les exemples présentés ci-après**
- [0152] Dans les exemples ci-après, les compositions testées seront nommées de F1 à F16 en fonction de l'ingrédient I utilisé et de sa concentration dans la composition finale :
- [0153]

[Tableaux2]

Concentration dans la composition testée	Propylène glycol (PG)	Glycérol	Vinaigre de vin	Chlorure de potassium (KCl)
0,30%				I10
0,50%				I11
1%				I12
1,50%				I13
2%				I14
2,50%				I15
3%				I16
10%	I1		I7	
11,25%		I4		
12%	I17			
14%	I18			
16%	I19			
18%	I20			
20%	I2		I8	
22,50%		I5		
30%	I3		I9	
33,75%		I6		

[0154] Les compositions témoins seront nommées F0.

[0155] Les compositions réalisées à partir de l'ingrédient I1 seront nommées F1, les compositions réalisées à partir de l'ingrédient I2 seront nommées F2, et ainsi de suite.

[0156] **EXEMPLE 1 - STABILITE DES SPORES BACILLUS à 1 et 2 MOIS des ingrédients I1 à I16**

I – PROBLEMATIQUE

[0157] L'objectif de cette analyse est d'évaluer la stabilité des spores de *Bacillus subtilis* et *B. licheniformis* conservées dans différentes compositions liquides, à température ambiante, pendant 1 et 2 mois de conservation.

II – MATERIEL ET METHODE

II.1 – Protocole

[0158] **Composition témoin (F0)** : Cette composition comprend

- [0159] - 50% d'une solution de bactéries dans l'eau. Cette solution de bactéries comprend 20% en masse par rapport au volume total de solution de bactéries d'une poudre bactérienne. La poudre bactérienne est constituée de poudre de spores de *Bacillus subtilis* et de *Bacillus licheniformis* (ratio 1 :1), concentrées à 3.2×10^{12} spores par gramme de poudre, et d'un support.
- [0160] - eau jusqu'à 100%
- [0161] **Compositions testées (F1 à F16)** : ces compositions correspondent à la composition témoin dans laquelle est ajouté l'un des ingrédients I1 à I16, où le volume d'eau est adapté jusqu'à 100%.
- [0162] 1- Distribuer 100 mL de chacune de ces compositions de F0 à F16 par pot, dans 3 pots de 180 mL de type collecteur d'échantillon droit avec bouchon à vis
- [0163] 2- Stocker les 51 pots à température ambiante (effectuer un suivi de la température de la pièce)

II.2 – Analyse

- [0164] Observation macroscopique : A 1 mois et 2 mois de conservation, évaluer l'aspect de la formulation (couleur, dépôt, trouble, consistance, développement de moisissures...) et la remise en suspension (floculation...)
- [0165] Analyse microbiologique : à J0, uniquement pour le témoin F0 ; à 1 mois et 2 mois de conservation, pour tous les pots de F0 à F16.
- [0166] Pour chaque point d'analyse, réaliser une énumération par dénombrement en macrométhode sur tous les pots. La macrométhode est un dénombrement sur des boîtes de culture de grande taille, en opposition à la microméthode, qui est un dénombrement en plaques avec puits :
- [0167] Pour chaque pot, réaliser les dilutions en double avec une solution de peptone-sel jusqu'à la dilution 10^{-6} ; bien agiter minimum 10s au Vortex avant de prélever ; déposer 0.5mL de la dilution 10^{-6} dans 2 boîtes de Petri (facteur de dilution = 2.10^6)
- [0168] Le peptone-sel est un diluant isotonique pour une récupération optimale des microorganismes (ISO/DIS 6649), à base de peptone et de chlorure de sodium.
- [0169] Couler environ 18mL de gélose PCA (Plate Count Agar) en surfusion à 46-50°C dans chaque boîte de Pétri
- [0170] La gélose PCA est un milieu recommandé pour le dénombrement standardisé des bactéries dans l'eau.
- [0171] Incuber 24h +/-6h à 37°C
- [0172] Après incubation, compter les colonies sur chaque boîte

II.3 – Interprétation des résultats

- [0173] Une diminution significative ($>0.3\log$) du niveau de la population dans un pot par rapport au témoin à J0 devra être confirmée par une seconde énumération ; si ce

résultat est confirmé, l'analyse est stoppée ; la formulation sera considérée comme instable à partir du précédent point.

[0174] Une augmentation significative ($>0.3\log$) du niveau de la population dans un pot par rapport au témoin à J0 devra être confirmée par une seconde énumération ; si ce résultat est confirmé, l'analyse est stoppée. Cela signifiera une croissance bactérienne (soit d'une contamination, soit d'une germination d'une spore) ; la formulation sera considérée comme instable.

[0175] Une évolution de l'aspect de la formulation (ex : développement de moisissures) ou une mauvaise remise en suspension des spores entraîne l'arrêt de l'analyse ; la formulation sera considérée comme instable.

III – RESULTATS

[0176] Les résultats sont compilés dans le tableau 3 suivant :

[0177] [Tableaux3]

Formule	ANALYSE A 1 MOIS	ANALYSE A 2 MOIS	ACCEPTABLE
F1 10%PG	bacille à l'observation microscopique	/	NON
F2 20%PG	-0,04 log	-0,05 log	OUI
F3 30%PG	-0,01 log	-0,04 log	OUI
F4 à F6 11,25% à 33,75% glycérol	Développement ma- croscopique	/	NON
F7 10% vinaigre	-0,08 log	-0,10 log	OUI
F8 20% vinaigre	-0,08 log	-0,15 log	OUI
F9 30% vinaigre	-0,14 log	-0,17 log	OUI
F10 à F16 0,3 à 3% KCL	Développement de biofilm	/	NON

[0178] *Tolérance : écart $< +/-0,3\log$

Observations :

[0179] Les 5 formules F2, F3, F7, F8 et F9 ne présentent pas de diminution significative de la population bactérienne d'un point à l'autre.

[0180] Avec le vinaigre, on observe une tendance à l'augmentation de l'écart, ce qui pourrait laisser présager une certaine instabilité sur une plus longue période (ex. 1 an).

[0181] Pour le vinaigre, un léger retard de croissance est observé pour une petite partie des spores.

IV – CONCLUSIONS

[0182] Sur les 16 compositions testées, seules les compositions F2, F3, F7, F8 et F9 sont jugées stables après 1 mois et 2 mois de conservation à température ambiante.

[0183] Ainsi, seuls les ingrédients I2, I3, I7, I8 et I9 permettent de garantir une stabilité des spores de *B.subtilis* et *licheniformis* acceptables.

[0184] **EXEMPLE 2 – ACTIVITE ANTI-GERMINATIVE DES SPORES des compositions F2, F3, F7, F8 et F9**

I – PROBLEMATIQUE

[0185] L'objectif de cette analyse est d'évaluer l'activité anti-germinative de différentes compositions, après inoculation de *Bacillus subtilis* et *B. licheniformis*, et incubation à 30°C dans un bouillon nutritif.

II – MATERIEL ET METHODE

II.1 – Protocole

[0186] **Composition témoin (F0)** : Cette composition comprend

[0187] - 50% d'un bouillon nutritif TSB concentré 2 fois

[0188] - 5% d'une solution de bactéries dans l'eau. Cette solution de bactérie comprend 2% en masse par rapport au volume total de solution de bactéries d'une poudre bactérienne. La poudre bactérienne est constituée de poudre de spores de *Bacillus subtilis* et de *Bacillus licheniformis* (ratio 1 :1), concentrées à 3.2×10^{12} spores par gramme de poudre, et d'un support.

[0189] - eau jusqu'à 100%.

[0190] **Compositions testées (F2, F3, F7, F8 et F9)** : ces compositions correspondent à la composition témoin dans laquelle est ajouté l'un des ingrédients I2, I3, I7, I8 et I9, où le volume d'eau est adapté jusqu'à 100%.

[0191] Le bouillon nutritif TSB ou tryptone-soja est un milieu hautement nutritif et d'usage général pour la culture des bactéries et des champignons. Ce milieu hautement nutritif permet la croissance de la plupart des germes. La présence dans la formule de tryptone et de peptone de soja permet un développement satisfaisant des germes exigeants sans addition de sérum ou autres éléments nutritifs.

[0192] Composition du bouillon nutritif TSB (en g/L):

[0193] [Tableaux4]

Hydrolysate tryptique de caséine	17,0
Peptone de soja	3,0
Chlorure de sodium	5,0
Phosphate dipotassique	2,5
Glucose	2,5

[0194] Distribuer 100 mL de chacune des compositions F0, F2, F3, F7, F8 et F9 par pot, dans 3 pots de 180 mL de type collecteur d'échantillon droit avec bouchon à vis

[0195] Incuber les 18 pots à 30°C

II.2 – Analyse

[0196] Observation macroscopique : idem exemple 1. Observations fréquentes de J1 à J30 pour chacun des pots F0, F2, F3, F7, F8 et F9.

[0197] Analyse microbiologique :

- [0198] • à J0 uniquement pour le pot témoin F0 ;
- à J30, pour tous les pots F0, F2, F3, F7, F8 et F9 en cas d'absence d'apparition de trouble bactérien jusqu'à J30.

[0199] A J0, effectuer une énumération des pots témoins :

- [0200] • Réaliser les dilutions en double jusqu'à la dilution 10^{-4} ; bien agiter mini 10s au Vortex avant de prélever ; déposer 0.5mL de la dilution 10^{-4} dans 2 boîtes de Pétri (facteur de dilution = $2 \cdot 10^4$)
- Couler environ 18mL de PCA en surfusion à 46-50°C dans chaque boîte de Pétri
- Pour énumérer les formes sporulées, insérer les tubes de dilution 10^{-4} 10min dans un Bain-Marie à 80°C ;
- Déposer ensuite 0.5mL de la dilution 10^{-4} dans 2 boîtes de Pétri (facteur de dilution = $2 \cdot 10^4$)

[0201] Couler environ 18mL de PCA en surfusion à 46-50°C dans chaque boîte de Pétri
Incuber 24h +/-6h à 37°C

Après incubation, compter les colonies sur chaque boîte.

[0202] En cas d'absence d'apparition de trouble bactérien jusqu'à J30, réaliser une énumération par dénombrement en macrométhode :

- [0203] • Réaliser les dilutions en double jusqu'à la dilution 10^{-4} ; bien agiter minimum 10s au Vortex avant de prélever ; déposer 0.5mL de la dilution 10^{-4} dans 2 boîtes de Petri (facteur de dilution = $2 \cdot 10^4$)
- Couler environ 18mL de PCA en surfusion à 46-50°C dans chaque boîte de Pétri
- Pour énumérer les formes sporulées, insérer les tubes de dilution 10^{-4} 10min dans un Bain-Marie à 80°C ;
- Déposer ensuite 0.5mL de la dilution 10^{-4} dans 2 boîtes de Petri (facteur de dilution = $2 \cdot 10^4$)
- Couler environ 18mL de PCA en surfusion à 46-50°C dans chaque boîte de Pétri
- Incuber 24h +/-6h à 37°C
- Après incubation, compter les colonies sur chaque boîte

II.3 – Interprétation des résultats

[0204] La formulation sera considérée comme anti-germinative en cas d'absence d'apparition de trouble bactérien et d'absence d'une augmentation significative (>0.3log) de la population de spores sur 30 jours.

III – RESULTATS

[0205] [Tableaux5]

Formule	ANALYSE A 1 MOIS (J30)		
	Observation macroscopique	Ecart FT // J0	Ecart FS // J0
F2 20%PG	R.A.S.	-0,09 log	+0,02 log
F3 30%PG	R.A.S.	-0,08 log	+0,04 log
F7 10% vinaigre	Développement d'un biofilm	/	/
F8 20% vinaigre	Développement d'un biofilm	/	/
F9 30% vinaigre	Développement d'un biofilm	/	/

[0206] *Tolérance : écart <+/-0,3log

[0207] FT : flore totale ; FS : flore sporulée

Observations :

[0208] Pour les compositions Vinaigre F7, F8 et F9, on observe un développement de bactéries naturellement présentes dans le vinaigre. Aucune analyse n'a donc été réalisée sur ces formules en ce qui concerne les écarts sur flore totale et flore sporulée par rapport à J0.

[0209] Pour les compositions PG F2 et F3, les écarts par rapport à J0 sont non significatifs que ce soit pour la flore totale ou la flore sporulée.

IV – CONCLUSIONS

[0210] Sur les 5 compositions testées, seules les compositions F2, F3 ne présentent pas de biofilm et ont été analysées pour leur activité anti-germinatives à J30, activité qui a été jugée positive.

[0211] Ainsi, seuls les ingrédients I2, I3, à savoir le PG à 20% et 30%, permettent de garantir la non germination des spores de *B.subtilis* et *licheniformis*.

[0212] **EXEMPLE 3 – ACTIVITE BACTERIOSTATIQUE des compositions F2, F3, F7, F8 et F9**

I – PROBLEMATIQUE

[0213] L'objectif de cette analyse est d'évaluer l'activité bactériostatique de différentes compositions, après inoculation d'un cocktail bactérien constitué des bactéries suivantes : une bactérie gram- à savoir : *E.coli*, une bactérie gram+ à savoir : *Staphylococcus aureus*, et une bactérie lactique à savoir : *Lactococcus lactis*, et incubation à 30°C dans un bouillon nutritif.

II – MATERIEL ET METHODE

II.1 – Protocole

[0214] **Composition témoin (F0)** : 50% d'un bouillon nutritif TSB concentré 2 fois + 5% d'une solution de cocktail bactérien + eau jusqu'à 100%

[0215] **Compositions testées (F2, F3, F7, F8 et F9)** : 50% d'un bouillon nutritif TSB concentré 2 fois + 5% d'une solution de cocktail bactérien + l'un des ingrédients I2, I3, I7, I8 et I9, complété par de l'eau jusqu'à 100%

[0216] La solution de cocktail bactéries est préparé comme ci-après. Pour 100 mL de solution :

- [0217] • Inoculer 5mL de bouillon TSB avec une souche *d'E.coli* ; 5mL de TSB avec une souche de *Staphylococcus aureus* et 5mL de TSB avec *Lactococcus lactis*
- Incuber une nuit à 37°C
 - Ajouter 0.5mL de chaque culture dans 98.5mL de diluant de type peptone-sel

[0218] Distribuer 100 mL de chacune des compositions F0, F2, F3, F7, F8 et F9 par pot, dans 3 pots de 180 mL de type collecteur d'échantillon droit avec bouchon à vis

[0219] Incuber les 18 pots à 30°C

II.2 – Analyse

[0220] Observation macroscopique : idem exemple 1 ; observations fréquentes de J1 à J7

[0221] Analyse microbiologique :

- [0222] • à J0 pour le témoin F0 ;
- à J7, pour tous les pots F0, F2, F3, F7, F8 et F9 en cas d'absence d'apparition de trouble bactérien à J7.

[0223] A J0, effectuer une énumération des pots témoins :

- [0224] • Réaliser les dilutions en double jusqu'à la dilution 10⁻⁴ ; bien agiter mini 10s au Vortex avant de prélever ; déposer 1mL de la dilution 10⁻⁴ dans 2 boîtes de Petri (facteur de dilution = 1.104)
- Couler environ 18mL de PCA en surfusion à 46-50°C dans chaque boîte de Pétri
 - Incuber 24h +/-6h à 37°C
 - Après incubation, compter les colonies sur chaque boîte

[0225] En cas d'absence d'apparition de trouble bactérien jusqu'à J7, réaliser une énumération par dénombrement en macrométhode :

- [0226] • Réaliser les dilutions en double jusqu'à la dilution 10⁻⁴ ; bien agiter mini 10s au Vortex avant de prélever ; déposer 1mL de la dilution 10⁻⁴ dans 2 boîtes de Petri (facteur de dilution = 1.10⁴)
- Couler environ 18mL de PCA en surfusion à 46-50°C dans chaque boîte de Pétri
 - Incuber 24h +/-4h à 37°C
 - Après incubation, compter les colonies sur chaque boîte

II.3 – Interprétation des résultats

[0227] La composition sera considérée comme bactériostatique *a minima* en cas d'absence d'apparition de trouble bactérien et d'absence d'une augmentation significative (>0.3log) de la population bactérienne sur 7 jours.

III – RESULTATS

[0228] [Tableaux6]

Formule	ANALYSE A 1 SEMAINE (J7)		
	Observations macroscopiques	Ecart FT // J0	Isolement
F2 20%PG	R.A.S.	diminution > 2 logs	présence des 3 bactéries (Lacto>Staph>E.coli)
F3 30%PG	R.A.S.	diminution > 2 logs	présence des 2 bactéries (Lacto>Staph)
F7 10% vinaigre	développement d'un biofilm	diminution > 2 logs	présence des 2 bactéries (E.coli>Lacto)
F8 20% vinaigre	développement d'un biofilm	diminution > 2 logs	absence de bactéries
F9 30% vinaigre	développement d'un biofilm	diminution > 2 logs	absence de bactéries

[0229] *Tolérance : augmentation <0,3 log

[0230] FT : flore totale

[0231] Isolement : étalement de 10µL de la solution sur la gélose de sang et observation de ce qui pousse par aspect des colonies.

Observations :

[0232] Pas de croissance observée mais une diminution significative des 3 populations bac-

tériennes sur toutes les compositions testées

[0233] Pour les compositions Vinaigre F7, F8 et F9, on observe le développement d'un biofilm.

IV – CONCLUSIONS

[0234] Sur les 5 compositions testées, seules les compositions F2, F3 ne présentent pas de biofilm et ont été analysées pour leur activité bactériostatiques à J7, activité qui a été jugée positive.

[0235] Ainsi, seuls les ingrédients I2, I3, à savoir le PG à 20% et 30%, permettent de garantir la non-prolifération de bactéries pathogènes ou non pathogènes.

[0236] **EXEMPLE 4 – ACTIVITE FONGISTATIQUE des compositions F2, F3, F7, F8 et F9**

I – PROBLEMATIQUE

[0237] L'objectif de cette analyse est d'évaluer l'activité fongistatique de différentes compositions, après inoculation de moisissures et incubation à 30°C dans un bouillon nutritif.

II – MATERIEL ET METHODE

II.1 – Protocole

[0238] **Composition témoin** : 50% d'un bouillon nutritif TSB concentré 2 fois + 5% d'une solution mycélienne + eau

[0239] **Compositions testées** : Les compositions testées correspondent aux formules F2, F3, F7, F8 et F9 décrites précédemment + 50% d'un bouillon nutritif TSB concentré 2 fois + 5% d'une solution mycélienne + eau

[0240] La solution mycélienne est une culture de mycéliums de champignons microscopique de nature indéterminée préparée comme suit. Pour 100 mL :

- [0241] • Inoculer 5mL de TSB pH5 avec une souche de mycélium. Ce mycelium est obtenu par prélèvement dans une préparation liquide à base de spores de *Bacillus subtilis* et *Bacillus licheniformis* (ratio 1 :1). Cette préparation liquide à base de spores de *Bacillus* est constituée d'un mélange de spores de *Bacillus* à une concentration de 3.3×10^{11} de spores par mL, d'acide citrique à 10%, et d'eau qsp, ladite préparation liquide étant naturellement contaminée par ledit mycélium.
- Incuber 3 à 7 jours à 30°C
 - Ajouter la culture dans 95mL d'eau ; agiter très fortement

[0242] Distribuer 100 mL de chacune des compositions F0, F2, F3, F7, F8 et F9 par pot, dans 3 pots de 180 mL de type collecteur d'échantillon droit avec bouchon à vis.

[0243] Incuber les 18 pots à 30°C

II.2 – Analyse

[0244] **Observation macroscopique** : Observations fréquentes de J1 à J30 sur tous les pots. Vérification si présence ou absence de développement mycélien.

[0245] **Analyse microbiologique** : Sur tous les pots F0, F2, F3, F7, F8 et F9 en cas d'absence d'apparition de développement mycélien jusqu'à J30, réaliser un étalement sur gélose PDA :

- [0246] • Prélever et étaler 1mL sur une gélose PDA
- Incuber 72h à 30°C
- Après incubation, observer la présence ou l'absence de développement mycélien

[0247] La gélose glucosée à l'extrait de pomme de terre (PDA) est milieu sélectif de levures et moisissures, prêt-à-liquéfier, utilisé pour les isolements, culture et dénombrement des levures et des moisissures dans les produits laitiers et les autres produits alimentaires notamment.

II.2 – Interprétation des résultats

[0248] La composition sera considérée comme fongistatique *a minima* en cas d'absence d'apparition de développement mycélien sur 30 jours.

III – RESULTATS

[0249] [Tableaux7]

Formule	ANALYSE SUR 4 SEMAINES (J30) Observation macroscopique
F2 20% PG	R.A.S.
F3 30% PG	R.A.S.
F7 10% vinaigre	développement biofilm
F8 20% vinaigre	développement biofilm
F9 30% vinaigre	développement biofilm

IV – CONCLUSIONS

[0250] Sur les 5 compositions testées, seules les compositions F2, F3 ne présentent pas de biofilm et ont été analysées pour leur activité fongistatique à J30, activité qui a été jugée particulièrement satisfaisante.

[0251] Ainsi, seuls les ingrédients testés I2 et I3, à savoir le PG à 20% et 30%, permettent de garantir la non-prolifération de champignons pathogènes ou non pathogènes.

[0252] **EXEMPLE 5 – ACTIVITE ANTI-GERMINATIVE DES SPORES des compositions F1, F2 et F17 à F20**

I – PROBLEMATIQUE

[0253] L'objectif de cette analyse est d'évaluer l'activité anti-germinative de différentes

compositions, après inoculation de *Bacillus subtilis* et *B. licheniformis*, et incubation à 30°C dans un bouillon nutritif.

II – MATERIEL ET METHODE

II.1 – Protocole

[0254] Le même protocole que l'exemple 2 a été utilisé avec les ingrédients I1, I2 et de I17 à I20 et les compositions testées F1, F2 et de F17 à F20.

II.2 – Analyse

[0255] La même méthode d'analyse que l'exemple 2 a été utilisée avec une période d'observation réduite à 2, 5 ou 8 jours.

II.3 – Interprétation des résultats

[0256] La formulation sera considérée comme anti-germinative en cas d'absence d'apparition de trouble bactérien sur 2, 5 et 8 jours ou en cas d'absence d'une différence significative ($>0.3\log$) entre la flore totale et la flore sporulée à J6.

III – RESULTATS

[0257]

[Tableaux8]

Formule	Observation macroscopique			ANALYSE A J6
	J2	J5	J8	log(FT) – log(FS)
F1 10%PG	Trouble, développement biofilm dans les 3 pots	/	/	/
F17 12% PG	Trouble dans les 3 pots- Confirmation de la présence de bacilles végétatifs par observation microscopique	/	/	/
F18 14% PG	R.A.S.	Trouble dans les 3 pots Confirmation de la présence de bacilles végétatifs par observation microscopique	/	/
F19 16% PG	R.A.S.	R.A.S.	R.A.S.	-0,04 log
F20 18% PG	R.A.S.	R.A.S.	R.A.S.	-0,01 log
F2 20% PG	R.A.S.	R.A.S.	R.A.S.	-0,01 log

[0258] *Tolérance : écart < 0,3log

[0259] FT : flore totale ; FS : flore sporulée

Observations :

[0260] Pour les compositions F1, F17 et F18, on observe un développement bactérien visible à l'œil nu. Aucun dénombrement n'a donc été réalisé sur ces formules.

[0261] Pour les compositions F2, F19 et F20, aucun trouble correspondant à un développement bactérien n'a été observé à l'œil nu. Des dénombrements ont donc été réalisés pour vérifier la stabilité des spores : aucun écart significatif n'a été observé entre la flore totale et la flore sporulée. Il n'y a donc pas de forme végétative dans les solutions analysées.

IV – CONCLUSIONS

[0262] Sur les 6 compositions testées, seules les compositions F2, F19 et F20 ne présentent pas de biofilm et ont été analysées pour leur activité anti-germinative à J6, activité qui a été jugée positive.

[0263] Ainsi, seuls les ingrédients I2, I19 et I20, à savoir le PG à 20%, 16% et 18%, permettent de garantir la non germination des spores de *B.subtilis* et *B.licheniformis*.

CONCLUSIONS GENERALES

[0264] Parmi toutes les solutions testées F1 à F16, seules les solutions F2, F3, F19 et F20 à 20%, 30%, 16% et 18%, respectivement, de PG satisfont tous les critères recherchés à savoir :

[0265] - compatibilité avec l'alimentation animale,

[0266] - stabilité des spores bactériennes,

[0267] - absence de germination des spores bactériennes,

[0268] - absence de développement de bactéries ou champignons pathogènes ou non pathogènes.

[0269] L'invention n'est pas limitée aux modes de réalisation présentés et d'autres modes de réalisation apparaîtront clairement à l'homme du métier.

Revendications

- [Revendication 1] Procédé de conservation de spore de bactérie du genre Bacillus, du genre Clostridium ou du genre Sporosarcina, comprenant une étape de mise en contact d'au moins une spore de bactérie du genre Bacillus, du genre Clostridium ou du genre Sporosarcina avec une composition liquide, ladite composition liquide étant essentiellement constituée, ou étant constituée :
- de plus de 14% de propylène glycol, et
 - moins de 86% d'eau,
- les pourcentages étant exprimés en volume par rapport au volume total de la composition liquide.
- [Revendication 2] Procédé selon la revendication 1, où ledit propylène glycol représente de 15% à 40 % en volume par rapport au volume total de la composition liquide, notamment de 20 à 30% en volume par rapport au volume total de la composition liquide.
- [Revendication 3] Procédé selon la revendication 1 ou la revendication 2, comprenant en outre une étape de maintien à température ambiante de ladite au moins une spore du genre Bacillus, du genre Clostridium ou du genre Sporosarcina en contact avec ladite composition liquide.
- [Revendication 4] Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, comprenant une étape de mise en contact d'au moins une spore à 10^{14} spores de bactéries du genre Bacillus, du genre Clostridium ou du genre Sporosarcina par mL de composition, avec une composition liquide, ladite composition liquide étant essentiellement constituée, ou étant constituée :
- de plus de 14% de propylène glycol, et
 - moins de 86% d'eau,
- les pourcentages étant exprimés en volume par rapport au volume total de la composition liquide.
- [Revendication 5] Utilisation d'une composition liquide pour la conservation à l'abri de contamination fongique et bactérienne, à température ambiante, d'au moins une spore de bactérie du genre Bacillus, du genre Clostridium ou du genre Sporosarcina, ladite composition liquide étant essentiellement constituée, ou étant constituée :
- de plus de 14% de propylène glycol, et
 - moins de 86% d'eau,

- les pourcentages étant exprimés en volume par rapport au volume total de la composition liquide.
- [Revendication 6] Utilisation selon la revendication 5, pour la conservation d'au moins une spore à 10^{14} spores de bactéries par mL de composition.
- [Revendication 7] Additif consistant en au moins une spore de bactérie du genre *Bacillus*, du genre *Clostridium* ou du genre *Sporosarcina* et une composition liquide, ladite composition liquide étant essentiellement constituée, ou étant constituée :
- de plus de 14% de propylène glycol, et
 - moins de 86% d'eau,
- les pourcentages étant exprimés en volume par rapport au volume total de la composition liquide.
- [Revendication 8] Additif selon la revendication 7, où ledit propylène glycol représente de 15% à 40 % en volume par rapport au volume total de ladite composition, notamment de 20 à 30%.
- [Revendication 9] Additif tel que défini dans la revendication 7 ou la revendication 8, pour une utilisation dans le cadre de la prophylaxie des infections parasitaires et bactériennes des animaux d'élevage.
- [Revendication 10] Produit liquide constitué essentiellement de, ou constitué de :
- au moins une spore de bactérie du genre *Bacillus*, du genre *Clostridium* ou du genre *Sporosarcina*, et
 - une composition liquide, ladite composition liquide étant essentiellement constituée, ou étant constituée :
- de plus de 14% de propylène glycol, et
 - moins de 86% d'eau,
- les pourcentages étant exprimés en volume par rapport au volume total de la composition liquide.

RAPPORT DE RECHERCHE

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

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

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

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

CONDITIONS D'ETABLISSEMENT DU PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.

Le demandeur a maintenu les revendications.

Le demandeur a modifié les revendications.

Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.

Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.

Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITES DANS LE PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

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

Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.

Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.

Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.

Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

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

WO 01/13927 A2 (GANEDEN BIOTECH INC [US]; FARMER SEAN [US]) 1 mars 2001 (2001-03-01)

US 2011/008390 A1 (WILHELM RUDOLF [DE] ET AL) 13 janvier 2011 (2011-01-13)

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

KATSUHARU YASUMATSU ET AL: "Stabilities of Enzymes in Polyhydric Alcohols", AGRICULTURAL AND BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 29, no. 7, 1 juillet 1965 (1965-07-01), pages 665-671, XP055587663, JP
ISSN: 0002-1369, DOI: 10.1080/00021369.1965.10858443

HUBALEK Z: "Protectants used in the cryopreservation of microorganisms", CRYOBIOLOGY, ACADEMIC PRESS INC, US, vol. 46, no. 3, 1 juin 2003 (2003-06-01), pages 205-229, XP002611832, ISSN: 0011-2240, DOI: 10.1016/S0011-2240(30)00046-4 [extrait le 2003-06-04]

WO 93/15611 A1 (UNIROYAL CHEM CO INC [US]) 19 août 1993 (1993-08-19)

WO 2017/055940 A1 (ALTUS BIOPHARM S A DE C V [MX]) 6 avril 2017 (2017-04-06)

US 2004/009160 A1 (VILLAMAR DANIEL F [US] ET AL) 15 janvier 2004 (2004-01-15)

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

NEANT