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

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle
Bureau international

(43) Date de la publication internationale
14 juin 2018 (14.06.2018)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2018/104336 A1

(51) Classification internationale des brevets :
C12Q 1/02 (2006.01) *A61K 35/747* (2015.01)
C12R 1/25 (2006.01) *C12R 1/225* (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01) *A23L 33/135* (2016.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2017/081575

(22) Date de dépôt international :
05 décembre 2017 (05.12.2017)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
1661967 05 décembre 2016 (05.12.2016) FR

(71) Déposants : **INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE)** [FR/FR] ; 101, rue de Tolbiac, 75013 Paris (FR). **CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)** [FR/FR] ; 3, Rue Michel Ange, 75016 Paris (FR). **UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON 1** [FR/FR] ; 43 Boulevard du 11 novembre 1918, 69100 Villeurbanne (FR). **ENS - ECOLE NORMALE SUPÉRIEURE DE LYON** [FR/FR] ; 46, Allée d'Italie, 69007 Lyon (FR). **INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUÉES DE LYON** [FR/FR] ; 20 avenue Albert Einstein, 69621 VILLEURBANNE (FR).

(72) Inventeurs : **VIDAL, Hubert** ; FACULTE DE MEDECINE LYON SUD - U1060 165 CHEMIN DU GRAND REVOYET - BP12, 69921 OULLINS (FR). **RIEUSSET, Jennifer** ; FACULTE DE MEDECINE LYON SUD - U1060 165 CHEMIN DU GRAND REVOYET - BP12, 69921 OULLINS (FR). **MAKKI, Kassem** ; FACULTE DE MEDECINE LYON SUD - U1060 165 CHEMIN DU GRAND REVOYET - BP12, 69921 OULLINS (FR). **MARTINO, Maria-Elena** ; ECOLE NORMALE SUPÉRIEURE DE LYON - IGFL 32 - 34 avenue Tony Garnier, 69007 LYON (FR). **STORELLI, Gilles** ; The University of Utah - School of Medicine Dept. of Human Genetics, SALT LAKE CITY, UT 84132 (US). **LEULIER, François** ; ECOLE NORMALE SUPÉRIEURE DE LYON IGFL 32 - 34 avenue Tony Garnier, 69007 LYON (FR).

(74) Mandataire : **COLLIN, Matthieu** ; Inserm Transfert, 7 rue Watt, 75013 PARIS (FR).

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

(84) États désignés *(sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible)* : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI

(54) **Title:** LACTIC ACID BACTERIA OF USE FOR TREATING METABOLIC DISEASES, ESPECIALLY TYPE 2 DIABETES

(54) **Titre :** BACTÉRIES LACTIQUES UTILES POUR TRAITER LES MALADIES MÉTABOLIQUES, NOTAMMENT LE DIABÈTE DE TYPE 2

(57) **Abstract:** The invention relates to the use of lactic acid bacteria for treating metabolic diseases, especially type 2 diabetes, and also to a method for screening bacteria capable of improving metabolic health and making it possible to decrease, or slow down, the progression of metabolic diseases. Using drosophila and mouse models, the inventors have demonstrated the beneficial effects of some bacterial strains on the metabolism via the measurement of several parameters, especially the oral glucose test. More particularly, the invention relates to a method for screening bacteria having intestinal tropism in a mammal, in which initially axenic drosophila larvae and/or mice are monocolonized with the bacterial strain to be tested, and these larvae are raised on a hypercaloric nutritional medium, which makes it possible to determine a favourable impact of the bacteria in the context of a hypercaloric diet and to infer a positive effect on metabolic health.

(57) **Abrégé :** L'invention concerne l'utilisation de bactéries lactiques pour traiter les maladies métaboliques, notamment le diabète de type 2, ainsi qu'une méthode de criblage de bactéries susceptibles d'améliorer la santé métabolique et permettant de diminuer, ou ralentir, la progression des maladies métaboliques. Par l'utilisation de modèles de drosophiles et de souris, les inventeurs ont démontré les effets bénéfiques de certaines souches de bactéries sur le métabolisme via la mesure de plusieurs paramètres, notamment le test oral au glucose. Plus particulièrement, l'invention concerne une méthode de criblage de bactéries à tropisme intestinal chez un mammifère dans lequel on monocolonise des larves de drosophiles et/ou des souris initialement axéniques par la souche de bactérie à tester, et on élève ces larves avec un milieu nutritionnel hypercalorique, ce qui permet de déterminer un impact favorable de la bactérie dans le cadre d'un régime hypercalorique et d'inférer un effet positif sur la santé métabolique.

WO 2018/104336 A1

[Suite sur la page suivante]

(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée:

— *avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))*

Bactéries lactiques utiles pour traiter les maladies métaboliques, notamment le diabète de type 2

La présente invention concerne une méthode de criblage de bactéries susceptibles d'améliorer la santé métabolique notamment de l'adulte, et permettant de diminuer, ou ralentir la progression, des maladies métaboliques, notamment celles liées à l'alimentation, telles que le diabète de type 2. La présente invention concerne aussi l'utilisation de certaines bactéries lactiques pour d'améliorer la santé métabolique notamment de l'adulte, et permettant de prévenir ou traiter les maladies métaboliques, notamment celles liées à l'alimentation, telles que le diabète de type 2.

Décrit comme « un organe additionnel », la communauté microbienne intestinale (ou microbiote intestinal) joue un rôle clé bénéfique pour l'hôte en exerçant de nombreuses fonctions biologiques, telles que l'aide à l'efficacité de la digestion, le métabolisme des substrats, la lutte contre les pathogènes, ou encore la mise en place et l'homéostasie des réponses immunitaires.

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

WO2015173386 décrit l'utilisation combinée d'un modèle drosophile et d'un modèle souris pour cribler des souches bactériennes permettant de favoriser la croissance juvénile humaine et animale en cas de sous-nutrition.

Pasco et Leopold, Plos One 2012, vol 7, 5, e36583, ont montré qu'un régime hypercalorique conduit chez la larve de drosophile à des altérations métaboliques ressemblant aux effets d'un diabète insulino-dépendant et à un retard de maturation se manifestant par un retard d'entrée en métamorphose (transition du stade larvaire au stade pupal). Les auteurs concluent que la drosophile pourrait servir de modèle pour cribler les gènes prédisposant au développement d'une résistance à l'insuline.

Les inventeurs ont trouvé que, de manière inattendue, des bactéries pouvaient avoir un effet favorable permettant d'améliorer certains paramètres métaboliques, peuvent être identifiées sur un modèle de drosophile et confirmées sur un modèle mammifère soumis à un régime hypercalorique (apport en sucre important). Le modèle drosophile décrit ci-après s'avère effectivement sensible à ces bactéries et cela de manière mesurable et possiblement corrélé avec un effet mesurable sur un mammifère soumis à un régime hypercalorique. Les inventeurs ont

en outre montré que des souches de bactéries sélectionnables sur ces modèles ont de manière inattendue une activité comparable chez la drosophile et les mammifères, avec un effet favorable sur les effets délétères d'un régime hypercalorique, aussi bien chez la drosophile que la souris.

L'invention concerne ainsi une méthode de criblage de bactéries à tropisme intestinal chez un mammifère, incluant l'homme, utilisant un modèle de drosophile axénique. On entend par organisme « axénique » un organisme (e.g. drosophile à un stade de son développement) élevé dans un environnement dépourvu de microorganismes et donc dépourvu de flore intestinale. Conformément à l'invention, ce modèle axénique se verra ensuite inoculé par la souche de bactérie à tester, le rendant monoxénique pour cette souche, et son évolution sera comparée à celle d'un contrôle ou d'un référent.

La bactérie a un « tropisme intestinal » chez un mammifère, ce qui signifie que la bactérie a la capacité de passer la barrière gastrique chez ce mammifère, soit naturellement soit en étant administrée dans une formulation gastro-protégée, et est capable de persister dans l'intestin. Ce tropisme intestinal permettra à une bactérie sélectionnée selon l'invention de produire un effet favorable sur la santé métabolique.

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

De manière avantageuse, les souches ayant répondu positivement au test sur modèle drosophile sont ensuite testées sur modèle mammifère, par exemple un modèle souris, possédant de préférence un statut conventionnel, à savoir un microbiote normal (entier).

L'invention propose donc une méthode de criblage de bactéries à tropisme intestinal, dans lequel on monocolonise des embryons de drosophiles initialement axéniques, par la souche de bactérie à tester, ce grâce à quoi l'on obtient des larves monoxéniques pour cette bactérie. On élève ces larves avec un milieu nutritionnel hypercalorique, c'est-à-dire à haute teneur en sucre. On mesure au moins un paramètre de maturation des larves, et on détermine si la bactérie a eu un effet significativement favorable sur le paramètre de maturation. On conclut le cas échéant que ladite souche a un effet favorable sur le paramètre de maturation.

On peut notamment conclure à un effet favorable en comparant à des données de référence préétablies et/ou à des données générées en parallèle sur des larves axéniques ou monocolonisés par une souche de référence.

Un effet favorable est ainsi retenu lorsque les larves monocolonisées par la souche testée présentent un paramètre de maturation en amélioration significative par rapport à un contrôle. Un contrôle peut notamment être constitué de larves axéniques élevées dans des conditions nutritionnelles similaires.

Un effet favorable est ainsi retenu lorsque les larves monocolonisées par la souche testée présentent un paramètre de maturation sensiblement égal ou amélioré par rapport à une référence. Une référence peut notamment être constituée de larves monocolonisées par une souche de référence qui présente elle-même un paramètre de maturation en amélioration significative par rapport à un contrôle correspondant à des larves axéniques élevées dans des conditions nutritionnelles similaires.

Il est aussi possible d'associer une référence et un contrôle.

Les données obtenues avec le groupe contrôle et/ou avec le groupe référent peuvent avoir été obtenue précédemment ou, de préférence, sont générées en parallèle, avantageusement à partir d'un même lot d'embryons que celui utilisé avec la souche à tester.

La méthode de criblage sur le modèle drosophile de bactéries à tropisme intestinal permettant d'améliorer des paramètres de maturation peut donc comprendre le fait de disposer et d'élever des larves de drosophile axéniques sur un milieu nutritionnel, de les inoculer avec la souche bactérienne à tester (les larves sont alors monoxéniques pour cette souche à tester), de mesurer ou déterminer un paramètre de maturation des larves, et de comparer les résultats obtenus avec les données obtenues avec des larves de drosophile axéniques élevées sur le même milieu nutritionnel (groupe contrôle) et/ou avec des larves de drosophile monoxéniques pour une souche de référence élevées sur le même milieu nutritionnel (groupe référent ou de référence).

Le milieu nutritionnel peut être tout milieu apte à permettre le développement des larves sur une période suffisante pour la comparaison, et de préférence, le milieu nutritionnel permet de conduire les larves au moins jusqu'à la métamorphose. Le milieu est avantageusement un milieu hypercalorique, c'est-à-dire riche en sucre, par exemple saccharose, cette richesse en sucre pouvant par exemple aller de 20 à 150 g de sucre par litre de milieu (avant gélification ou solidification si milieu solide ou semi-solide). Typiquement le milieu nutritionnel est un milieu solide ou semi-solide contenant de la levure inactivée et du sucre. Il peut par exemple comprendre de la levure inactivée (10 g/l), de l'agar ou autre gélifiant (7.14 g/l), de l'eau (1L) et du saccharose (50 g/l). Ce milieu est contenu dans des récipients adaptés, par exemple des boîtes de pétri. Il peut être constitué, pour 1 litre de milieu, de 7,14 g d'agar, 10 g de levure inactivée et 50g de saccharose ; le milieu est cuit dans l'eau bouillante

pendant 10 min, puis laissé à refroidir pour solidification. A contrario, un milieu standard comprendra de la levure inactivée, mais pas de sucre ajouté.

Pour l'inoculum, les souches bactériennes peuvent être suspendues dans un tampon salin (e.g. PBS) et inoculées à une quantité suffisante, par exemple d'environ 10^7 CFU à environ 10^9 CFU, notamment d'environ 10^8 CFU, typiquement pour environ 7 ml de milieu nutritionnel, un tel volume étant adapté à un groupe de larves standard selon l'invention, par exemple environ 40 embryons ou larves.

Le paramètre de maturation peut être par exemple la prise de taille des larves ou, de préférence, leur maturation, à savoir leur entrée en métamorphose. De préférence, on travaille sur des groupes de plusieurs embryons, notamment de 20 à 60 embryons par groupe, typiquement 40. Chaque groupe peut faire avantageusement l'objet de plusieurs réplicas, typiquement 6 réplicas. L'on détermine des moyennes à comparer aux valeurs contrôle et/ou de référence. Par exemple, on utilise la détermination du J50, à savoir la durée au bout de laquelle 50% des animaux ont achevé leur phase de croissance et sont entrés en métamorphose. Cela permet de comparer les moyennes entre groupe test et groupe contrôle et/ou de référence.

D'un point de vue pratique on utilise de préférence des *Drosophila melanogaster* (e.g. souche *Drosophila yw*, ou toute autre souche dites "sauvage").

La méthode avec le modèle drosophile peut notamment comprendre les étapes suivantes :

(1) on dispose d'un lot d'embryons issus de parents *Drosophila melanogaster* (e.g. souche Drosophila yw, ou toute autre souche dites "sauvage") axéniques.

(2) à J0: on répartit ces embryons en au moins 2 groupes (notamment de 20 à 60 embryons, par exemple 40, de préférence réalisé en plusieurs réplicas, notamment 6 réplicas) sur du milieu nutritionnel hypercalorique, comprenant notamment de la levure inactivée, de l'agar, de l'eau et du saccharose, dans des récipients adaptés, par exemple des boîtes de pétri. Un premier groupe d'embryons est inoculé avec la souche bactérienne à tester (groupe monoxénique). Pour l'inoculum, les souches bactériennes peuvent être suspendues dans un tampon salin (e.g. PBS) et inoculées à une quantité suffisante, par exemple d'environ 10^7 CFU à environ 10^9 CFU, notamment d'environ 10^8 CFU par récipient ou boîte de pétri (notamment volume de 7 ml de milieu nutritif).

(2a) Un groupe formant le groupe axénique est inoculé avec un tampon salin stérile.

(2b) Un groupe faisant intervenir une souche de référence à laquelle on peut comparer les effets de la souche à tester, cette souche de référence monocolonisant un groupe d'embryons.

On conduit l'élevage à une température comprise entre environ 24 et environ 26 °C, typiquement environ 25°C, de préférence avec un cycle jour nuit, par exemple de 12h/12h.

Cette étape (2) peut avantageusement inclure le groupe contrôle et le groupe référence. Dans ce cas, l'étape (2) peut devenir :

(2) à J0: on répartit ces embryons en au moins 2, de préférence 3 groupes (notamment de 20 à 60 embryons, e.g. 40, de préférence réalisé en plusieurs réplicas, notamment 6 réplicas) dans des boites de pétri ou autre récipient contenant du milieu nutritionnel comprenant de la levure inactivée, de l'agar, de l'eau et du saccharose. Un premier groupe d'embryons est inoculé avec la souche bactérienne de référence, qui possède un effet positif dans ce test; on peut ainsi utiliser la souche *L. plantarum* WJL.

Suivant une modalité, au moins un autre groupe est inoculé avec la souche à tester, on peut aussi tester en parallèle plus d'une souche, et donc inoculer autant de groupes (groupes monoxéniques). Les souches bactériennes peuvent être suspendues dans un tampon salin (e.g. PBS) et inoculées à une quantité suffisante, par exemple d'environ 10^7 CFU à environ 10^9 CFU, notamment d'environ 10^8 CFU par récipient ou boîte de pétri (notamment volume de 7ml de milieu nutritif).

Suivant une autre modalité, un groupe formant le groupe axénique est inoculé avec un tampon salin stérile.

Suivant une autre modalité, les deux groupes précités sont inclus.

On conduit l'élevage à une température comprise entre environ 24 et environ 26 °C, typiquement environ 25°C, de préférence avec un cycle jour nuit, par exemple de 12h/12h.

(3) On détermine ensuite le nombre d'animaux qui terminent leur phase de croissance juvénile dans les différentes conditions d'inoculations, selon une fréquence déterminée (qui définit des périodes), de préférence quotidiennement. Pour ce faire on peut notamment compter le nombre de pupes formées, sur la période considérée, de préférence chaque jour. L'entrée en pupe signe la fin de la phase de croissance juvénile et l'entrée en métamorphose.

(4) On compare les résultats de la souche testée avec le groupe axénique et/ou avec la souche de référence. On peut raisonner avec le « J50 » dans chaque condition, à savoir la durée au bout de laquelle 50% des animaux ont achevé leur

phase de croissance. On détermine ensuite le J50 moyen de chacun des groupes, et on compare les moyennes obtenues.

On peut par exemple représenter graphiquement le pourcentage cumulé d'animaux entrés en métamorphose relatif au nombre total de pupes obtenues à la fin de l'expérience (environ 40 pupes, avec un lot initial de 40 embryons). Ces courbes permettent de calculer graphiquement le « J50 » dans chaque condition, à savoir la durée au bout de laquelle 50% des animaux ont achevé leur phase de croissance. On détermine ensuite le J50 moyen de chacun des groupes, et on compare les moyennes obtenues.

On tire les conclusions de la ou des comparaisons. La souche bactérienne testée peut être considérée comme répondant positivement au test si la moyenne du J50 d'entrée en métamorphose du groupe inoculé avec cette souche est inférieure à la moyenne du J50 d'entrée en métamorphose du groupe axénique, avec une valeur de p inférieure ou égale à 0,001, de préférence inférieure ou égale à 0,0001 dans le test statistique de Mann-Whitney. Le test est réalisé sur l'ensemble du jeu de données des valeurs des J50 des deux groupes.

La souche bactérienne testée peut être considérée comme ayant un effet fort si la moyenne du J50 d'entrée en métamorphose du groupe inoculé avec cette souche est inférieure à la moyenne du J50 d'entrée en métamorphose du groupe *L. plantarum* WJL, avec une valeur de p inférieure ou sensiblement égale à 0,01 dans le test statistique de Mann-Whitney. Le test est réalisé sur l'ensemble du jeu de données des valeurs des J50 des deux groupes.

La souche bactérienne testée peut être considérée comme ayant un effet marqué si la moyenne du J50 d'entrée en métamorphose du groupe inoculé avec cette souche est inférieure à la moyenne du J50 d'entrée en métamorphose du groupe *L. plantarum* NIZO2877, avec une valeur de p inférieure ou sensiblement égale à 0,01 dans le test statistique de Mann-Whitney. Le test est réalisé sur l'ensemble du jeu de données des valeurs des J50 des deux groupes.

La souche bactérienne à tester à la recherche d'un effet favorable sur certains paramètres métaboliques peut être testée sur un modèle mammifère, notamment souris, possédant un microbiote normal. Ce test peut être appliqué d'emblée ou après présélection de la souche sur un modèle drosophile, notamment le modèle drosophile axénique de l'invention. Le principe de la méthode qui va être décrit à propos des souris, peut être extrapolé à un autre modèle mammifère.

Suivant une modalité de l'invention, une souche de bactérie ayant répondu positivement au test sur modèle drosophile est ensuite testée sur modèle mammifère,

de préférence un modèle souris, possédant un microbiote normal, et recevant une nourriture riche en sucre et en lipides (régime hypercalorique), et l'on mesure un ou plusieurs paramètres choisis notamment parmi mesure de glycémie sanguine, tolérance au glucose, tolérance au pyruvate, une amélioration de l'un de ces paramètres signant un effet favorable de la bactérie sur le ou les paramètres du modèle, la souche en question pouvant être alors sélectionnée pour sa capacité à améliorer un ou plusieurs de ces paramètres.

La méthode peut comprendre l'élevage d'un groupe de souris (par exemple de 5 à 20 souris, typiquement 10 souris), possédant un statut conventionnel (possédant un microbiote entier), et recevant une nourriture riche en sucre et en lipides (régime hypercalorique).

On peut par ailleurs disposer de données comparatives préalablement obtenues sur des souris possédant un statut conventionnel (possédant un microbiote entier), par exemple de 5 à 20 souris, typiquement 10 souris, élevées avec accès libre à une nourriture de type standard. De préférence cependant, on élève ce groupe de souris en parallèle avec le groupe sous régime hypercalorique.

Par régime standard, on entend notamment un régime classiquement utilisé pour nourrir les animaux de laboratoire sans induire de maladies métaboliques. Un régime typique peut être composé de 16,9% de protéines, 4,3% de lipides et 55,5% de glucides (dont ~1% de saccharose et 0% de maltodextrine).

Comme régime hypercalorique, on entend un régime qui diffère du standard par des teneurs en lipides et sucres élevées. Ces régimes sont classiquement utilisés pour induire une obésité, une résistance à l'insuline et un diabète chez les rongeurs. Un régime hypercalorique typique peut être composé de 20% de protéines, 36,1% de lipides et 35,1% de saccharose et de maltodextrine.

Différentes mesures peuvent être effectuées sur les groupes de souris. Elles peuvent être combinées deux à deux ou être toutes réalisées.

Une mesure de glycémie sanguine peut être effectuée sur les groupes de souris. Une ou plusieurs mesures peuvent être effectuées, les mesures étant bien entendu échelonnées dans le temps lorsqu'il y en a plusieurs. De préférence, la mesure de glycémie est précédée par une période de jeûne, notamment de plusieurs heures, typiquement 6 heures environ.

Un test de tolérance au glucose peut être effectué dans le but de mesurer la capacité des animaux à stocker plus ou moins le glucose circulant suite à une injection par voie intrapéritonéale de ce dernier. La glycémie est mesurée à temps zéro, ensuite les animaux sont injectés avec du glucose (par exemple 2g/kg), par exemple par voie intrapéritonéale, et différentes mesures de glycémie sont réalisée à

différents temps (par exemple 15, 30, 60 et 90 minutes post-injection) pendant l'expérimentation.

Un test de tolérance au pyruvate peut être réalisé dans le but d'observer la fonction hépatique qui est dérégulée par le régime hypercalorique. Comme décrit pour le test de tolérance au glucose, le test de tolérance au pyruvate consiste à injecter du pyruvate (par exemple 1,5g/kg), par exemple par voie intrapéritonéale. Le taux de glucose est mesuré à différents temps, par exemple 0, 15, 30, 60 et 90 min.

La méthode avec le modèle souris peut comprendre les étapes suivantes :

(1) des souris (par exemple issues de la lignée C57BL/6 et âgées de 4 semaines) possédant un statut conventionnel (possédant un microbiote entier) sont élevés en deux groupes de plusieurs individus (par exemple de 5 à 20 souris, typiquement 10 souris), l'un avec accès libre à une nourriture de type standard pour les souris, l'autre une nourriture riche en sucre et en lipides (régime hypercalorique).

(2) L'administration de la souche bactérienne à tester débute en même temps que la mise des animaux sous ces régimes alimentaires, standard et hypercalorique. L'administration des bactéries par voie orale peut être effectuée plusieurs fois, par exemple 5 fois (à des jours différents), par semaine avec d'environ 10^8 CFUs à environ 10^{10} CFUs, typiquement environ 10^9 CFUs par souris à chaque administration, pour une durée totale de plusieurs semaines, typiquement 10 semaines. Les souris contrôles ne recevant pas les bactéries sont gavées avec l'excipient (solution saline).

(3) Les souris sont caractérisées métaboliquement grâce à une mesure de la glycémie, cette mesure étant de préférence effectuée après une période de jeûne, notamment de 4 à 8 heures, typiquement après 6 heures de jeûne. La mesure est effectuée par un prélèvement d'une goutte de sang, par exemple à la queue, et en utilisant un lecteur de glycémie ou toute autre méthode ou outils appropriés. Ces mesures sont réalisées de préférence 2 à 4, typiquement 4, semaines après le début du nourrissage décrit plus haut (post-gavage).

(4) Un test de tolérance au glucose peut également être réalisé sur ces souris dans le but de mesurer la capacité des animaux à stocker plus ou moins le glucose circulant suite à une injection par voie intrapéritonéale de ce dernier. Les souris sont mises à jeun pendant de 4 à 8 heures, typiquement 6 heures. La glycémie est mesurée à temps zéro, ensuite les animaux sont injectés avec du glucose (2g/kg), par exemple par voie intrapéritonéale, et différentes mesures de glycémie sont réalisées à différents temps (par exemple 15, 30, 60 et 90 minutes post-injection) pendant l'expérimentation.

(5) Les souris peuvent être caractérisées à nouveau métaboliquement en utilisant les mêmes approches décrites précédemment (glycémie à jeun et/ou test de tolérance au glucose). Par exemple 9 et 10 semaines post-gavage.

(6) Un test de tolérance au pyruvate peut être réalisé dans le but d'observer la fonction hépatique qui est dérégulée par le régime hypercalorique. Comme décrit pour le test de tolérance au glucose, le test de tolérance au pyruvate consiste à injecter du pyruvate (par exemple 1,5g/kg) par voie intrapéritonéale. Le taux de glucose est mesuré à différents temps, par exemple 0, 15, 30, 60 et 90 min.

Les animaux sont sacrifiés (par exemple à la fin de la semaine 10 post-gavage) et les différents tissus peuvent être collectés afin de réaliser des expériences plus approfondies comme des dosages sériques dans le sang (insuline), notamment par ELISA. Le dosage de l'insuline peut être réalisé sur du plasma pur (souris standard) ou dilué au ¼ (souris mises sous régime hypercalorique) en utilisant des kits ELISA commerciaux spécifiques pour la détection de l'insuline en suivant les instructions du fabricant.

La souche de bactérie lactique est considérée comme répondant positivement au test si la glycémie et l'insuline à jeun ainsi que les éventuels tests métaboliques sont significativement inférieurs aux groupes contrôles correspondants (souris recevant l'excipient), avec une valeur de probabilité d'erreur p inférieure à 0,05 dans le test Mann-Whitney.

Le criblage peut aussi intégrer un groupe de souris qui sera inoculé avec une souche bactérienne de référence, qui possède un effet positif dans ce test; on peut ainsi utiliser la souche L. plantarum WJL. La souche bactérienne testée est considérée comme répondant très positivement au test si la glycémie et l'insuline à jeun ainsi que les éventuels tests métaboliques sont significativement inférieurs ou sensiblement égaux à ce groupe de référence, avec une valeur de probabilité d'erreur p inférieure à 0,05 dans le test Mann-Whitney.

L'invention propose notamment des souches de bactérie à tropisme intestinal appartenant aux familles suivantes : Lactobacillaceae, Streptoccaceae, Enterococcaceae, Leuconostocaceae, Bifidobacteriaceae. Suivant une modalité, l'invention utilise une ou des souches du genre *Lactobacillus,* en particulier de l'une des espèces suivantes, *Lactobacillus delbrueckii, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus fermentum, Lactobacillus casei, Lactobacillus paracasei, Lactobacillus rhamnosus.*

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

paracasei, Lactobacillus rhamnosus. Suivant une modalité, la souche est choisie parmi les espèces *Lactobacillus plantarum, Lactobacillus fermentum, Lactobacillus casei.*

Suivant un mode de réalisation, la souche de bactérie est choisie parmi *L. plantarum* WJL, *L. plantarum* G821 (CNCM I-4979), *L. plantarum* NIZO2877, *L. casei* ATCC 393, *L. casei* L919, *L. paracasei* ATCC25302, *L. paracasei* Shirota, *L. fermentum* ATCC9338, *L. rhamnosus* L900, *L. rhamnosus* L908, *L. rhamnosus* GG. Suivant une modalité, la souche est choisie parmi *L. plantarum* WJL, *L. plantarum* G821, *L. casei* ATCC 393, *L. casei* L919, *L. fermentum* ATCC9338.

Les souches ayant été sélectionnées sur le modèle drosophile, sur le modèle souris ou sur les deux modèles sont considérées comme ayant un effet favorable sur la santé métabolique du mammifère cible, dont l'homme. Le modèle souris ou similaire a en outre l'avantage de donner des indications précises sur le ou les paramètres mesurés tels que la glycémie sanguine, le test de tolérance au glucose, le test de tolérance au pyruvate. Ceci permet de prédire un effet favorable de la souche chez le mammifère cible sur la glycémie, la tolérance au glucose et/ou la tolérance au pyruvate (capacité à baisser ou contenir le taux de glucose chez un patient sain ou ayant une intolérance au glucose ou en diabète de type 2, à améliorer la tolérance au glucose et/ou au pyruvate, à améliorer le statut d'un individu ayant une intolérance au glucose ou en diabète de type 2)).

On retient notamment une souche de bactérie ayant conduit à un effet favorable sur le modèle drosophile et sur le modèle mammifère, comme ayant un effet favorable sur la santé métabolique.

Les bactéries répondant positivement à la méthode de l'invention sont utilisables pour diminuer les maladies métaboliques, en particulier l'intolérance au glucose et/ou le diabète de type 2 ou ralentir leur progression.

Pour sélectionner des bactéries destinées à la diminution, ou au ralentissement de la progression, des maladies métaboliques, en particulier de l'intolérance au glucose et/ou du diabète de type 2, on préfère suivre au moins deux des paramètres susvisés sur le modèle mammifère, de préférence les trois paramètres : glycémie à jeun, tolérance au glucose et tolérance au pyruvate.

La présente invention a aussi pour objet une composition comprenant au moins une souche de bactérie ayant un tropisme intestinal, en particulier une bactérie lactique de l'espèce *L. plantarum*, pour utilisation pour la prévention et/ou le

traitement des maladies métaboliques, en particulier le diabète de type 2. A titre d'exemple, on peut citer la souche suivante : *L. plantarum* WJL. L. plantarum WJL (Eun-Kyoung Kim et al., Genome Announcements, November/December 2013, vol. 1, n° 6 e00937-13, GenBank AUTE00000000, Lactobacillus plantarum WJL, whole genome shotgun sequencing project). Cette souche WJL a été initialement isolée et peut être isolée de la drosophile (JH Ryu et al., Science 2008, 319 : 777-782). D'autres souches peuvent être identifiées parmi les bactéries à tropisme intestinal et notamment parmi les espèces et souches mentionnées plus haut, notamment parmi les souches *L. plantarum* G821 et *L. plantarum* NIZO2877. La souche G821 est divulgué dans WO2015173386 et déposée à la Collection Nationale de Culture de Microorganismes (Institut Pasteur) sous le numéro d'enregistrement CNCM I-4979 le 11 mai 2015. La souche G821 a été obtenue par évolution expérimentale, c'est-à-dire par accumulation et sélection de variants naturels de la souche L. plantarum NIZO2877 (collection NIZO (2877)).

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

La composition peut notamment comprendre la ou les bactéries lactiques sous forme vivante. La composition peut se présenter sous une forme prête à l'emploi ou à mélanger ou diluer avec un aliment, un excipient ou un liquide alimentaire tel que de l'eau de boisson.

Il peut s'agir d'une suspension bactérienne, qui peut être congelée et décongelée avant usage.

Il peut s'agir d'une poudre lyophilisée, pouvant être utilisée telle quelle, sous forme de poudre, de granulés, de comprimé, de bolus, de capsule, de gélule, ou utilisée après reprise dans un véhicule approprié. Cette composition peut comprendre un excipient de lyophilisation classique.

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

Suivant un mode de réalisation, la composition est une composition solide, e.g. comprimé, bolus, gélule, capsule, gastro-protégée permettant de passer

l'estomac et libérer les bactéries dans l'intestin. Selon une modalité, la forme, notamment granulés, est utilisable en alimentation en milieu aqueux, pour les poissons notamment.

Suivant un mode de réalisation, la composition est un liquide ou est à dissoudre dans un liquide ou à mettre en suspension dans un liquide, par exemple l'eau de boisson, dans ce cas la composition est initialement solide, e.g. poudre, granulé, comprimé dissolvable, par exemple comprimé effervescent, ou comprimé déliquescent dans le liquide.

Suivant un mode de réalisation, la composition est solide, e.g. poudre, granulé, comprimé, bolus, et destinée ou apte à être mélangée à un aliment.

Suivant un mode de réalisation, la composition est solide, sous une forme prête à l'emploi sans besoin de mélange à un aliment, mais pouvant être néanmoins mélangée à un aliment, par exemple comprimé ou bolus appétant.

L'invention a aussi pour objet une méthode de traitement probiotique pour la prévention et/ou le traitement des maladies métaboliques, en particulier le diabète de type 2, comprenant l'administration à un mammifère incluant l'homme, d'une composition selon l'invention. Par mammifère, en plus de l'homme, on entend les animaux d'élevage, notamment grands animaux, bovin et porc par exemple, les animaux de sport, notamment cheval, et les animaux de compagnie, notamment chat et chien. Suivant une caractéristique de l'invention, on exclut la souris et/ou de manière plus générale les rongeurs. De préférence, la composition est administrée par voie orale.

Ce traitement probiotique comprend l'administration d'une quantité suffisante d'une composition telle que décrite ci-dessus au patient humain ou mammifère. La méthode comprendra l'administration en une ou plusieurs fois, pouvant être échelonnée sur la période de traitement, de doses de composition selon l'invention. Les doses peuvent être fractionnées pour faciliter l'administration. La fréquence d'administration est notamment comprise entre une dose (unique ou fractionnée) tous les jours et une dose tous les mois. Typiquement, la fréquence d'administration sera comprise entre une dose (unique ou fractionnée) tous les jours et une dose toutes les semaines, voire tous les 2, 3, 4, 5 ou 6 jours. Chaque dose (unique ou fractionnée) représente notamment plusieurs grammes à plusieurs dizaines de gramme de composition.

La méthode comprend notamment l'administration d'une composition comprenant une quantité d'environ 10^5 à environ 10^{12}, notamment d'environ 10^6 à environ 10^{12}, de préférence d'environ 10^8 à environ 10^{12} cellules bactériennes

formant des colonies CFU par gramme de composition (par cellules bactériennes, on entend une souche de bactérie unique conforme à l'invention ou un mélange d'au moins deux bactéries, conformes à l'invention).

La méthode comprend de préférence l'administration d'une composition comprenant la ou les bactéries lactiques sous forme vivante.

La forme de la composition peut être solide ou liquide et prendre l'une quelconque des formes présentées *supra*.

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

La figure 1 est un graphique issue des données du tableau 1 représentant l'effet de différentes souches de *L. plantarum* (souches WJL et NIZO2877) sur la correction du temps d'entrée en métamorphose de larves de drosophiles alimentées sur une base de levure et de saccharose (10 g de levure inactivée pour 50 g de saccharose). Ces résultats démontrent que les deux souches présentent la capacité de tamponner les effets délétères d'une nutrition hypercalorique sur la date d'entrée en métamorphose et que la souche WJL est plus performante que la souche NIZO2877. La souche WJL présente un effet marqué et la souche NIZO2877 un effet modéré (** $p<0,01$).

La figure 2 regroupe trois graphiques issues des données des tableaux 2A,B et C montrant l'impact de souches de *L. plantarum* sur les paramètres métaboliques de souris sous régime alimentaire normal (conventionnel – Standard Calory Diet, SCD). Panel A: Dès 4 semaines de traitement, *L. plantarum*^{WJL} améliore la glycémie à jeun (6 heures de jeune avant mesure) et (panels B-C) dès 9 semaines de traitement la tolérance au glucose (IP-GTT = test de tolérance au glucose par voie intraperitonéale ; AUC : aire sous la courbe). La souche NIZO2877 ne montre pas d'effet significatif sur ces paramètres.. * $p<0,05$; ** $p<0,01$.

La figure 3 regroupe six graphiques issus des données des tableaux 3 A,B,C,D,E et F montrant l'impact de l'administration quotidienne de 10^9 CFU de *L. plantarum*^{WJL}, sur le métabolisme du glucose de souris sous régime alimentaire riche en calories (High Calory Diet: HCD).. 9 semaines d'administration améliorent de manière prononcée (A) la glycémie à jeun, (B-C) la tolérance au glucose (GTT; AUC : aire sous la courbe), (D-E) la tolérance au pyruvate (PTT; AUC : aire sous la courbe) et (F) l'insulinémie à jeun ce qui démontre des propriétés antidiabétiques marquées de la souche *L. plantarum*^{WJL}, sur le métabolisme du glucose (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

La figure 4 montre que Lp^{WJL} augmente la taille des îlots pancréatiques chez les souris avec régime standard.

La figure 5 décrit que Lp^{WJL} stimule la densité de cellules L de de l'Iléon chez les souris avec régime standard (quantification des cellules GLP1 positives ; n=6 souris par groupe).

EXEMPLES :

Exemple 1 : modèle drosophile se rapportant à la Figure 1

Le test drosophile est typiquement mené de la manière suivante :

- on dispose d'un lot d'embryons issus de parents *Drosophila melanogaster* (souche *Drosophila yw*) axéniques ;
- à J0: on répartit ces embryons en au moins 3 groupes (40 embryons, réalisé en 6 replicats pour un total de 240 embryons par groupe) dans des boites de pétri contenant du milieu nutritionnel comprenant de la levure inactivée, de l'agar, de l'eau et du saccharose. Nous étudions au minimum 3 groupes : un premier groupe d'embryons est inoculé avec la souche bactérienne de référence *L. plantarum*^{WJL}, et un ou plusieurs groupe(s) sont inoculés avec la(les) souche(s) à tester (groupes monoxéniques ; dans l'exemple de réalisation souche NIZO2877). Pour l'inoculum, les souches bactériennes sont suspendues dans un tampon salin (e.g. PBS) et sont inoculées à une quantité d'environ 10^8 CFU par boîte de pétri. Enfin, le groupe formant le groupe axénique est inoculé avec un tampon salin stérile. On conduit l'élevage à environ 25°c, avec un cycle jour nuit de 12h/12h. Typiquement le milieu nutritionnel est constitué, pour 1 litre de milieu, de 7,14 g d'agar, 10 g de levure inactivée et 50g de saccharose. Le milieu est cuit dans l'eau bouillante pendant 10 min, puis laissé à refroidir pour solidification.
- On détermine ensuite quotidiennement le nombre d'animaux qui terminent leur phase de croissance juvénile dans les différentes conditions d'inoculations. Pour ce faire nous comptons le nombre de pupes formées chaque jour. L'entrée en métamorphose signe la fin de la phase de croissance juvénile.
- Nous représentons ensuite graphiquement **(Figure 1)** la date à laquelle 50% des animaux sont entrés en métamorphose.
- On compare les moyennes obtenues: la souche bactérienne testée est considérée comme répondant positivement au test si la moyenne du J50 d'entrée en métamorphose du groupe inoculé avec cette souche est inférieure à la moyenne du J50 d'entrée en métamorphose du groupe axénique, avec une valeur de p

inférieure ou égale à 0,01, dans le test statistique de Mann-Whitney. Le test est réalisé sur l'ensemble du jeu de données des valeurs des J50 des deux groupes.

La figure 1 présente les données obtenues en termes de J50 d'animaux entrés en métamorphose relatif au nombre total de pupes obtenues à la fin de l'expérience, dans l'exemple Axénique, *L. plantarum*^{WJL} et *L. plantarum*^{NIZO2877}

Les J50 calculés sont présentés dans le tableau 1 (données brutes de la figure 1)

	J50 entrée en métamorphose						moyenne	écart type
Axénique	13,8	13,8	13,9	14,2	13,6	14	13,8833333	0,20412415
L.plantarum ^{WJL}	8,7	8,9	8,7	7,8	8,3	8,3	8,45	0,39874804
L.plantarum ^{NIZO2877}	12,17	9,2	10,5	11,1	10,5	11,1	10,7616667	0,9785789

	Analyse statistique			
	comparaison animaux axéniques		comparaison/ L.plantarumWJL	
	valeur de p	signification statistique	valeur de p	signification statistique
Axénique	n/a	n/a	<0,01	**
L.plantarumWJL	<0,01	**	n/a	n/a
L.plantarum NIZO2877	<0,01	**	<0,01	**

	Interprétation du test qualitatif (niveau quantitatif)
L.plantarumWJL	SPM (effet marqué)
L.plantarum NIZO2877	SPM (effet intermediaire)
	SPM= souche promotrice de croissance

Exemple 2 : modèle souris

Des souris issues de la lignée C57BL/6 et âgées de 4 semaines ont été utilisées dans cette étude. Les animaux possèdent un statut conventionnel (possédant un microbiote entier) et sont élevés dans des conditions sanitaires contrôlées. Ils ont un accès libre à deux types d'alimentation : la première est une nourriture de type standard et la deuxième est riche en sucre et en lipides (régime hypercalorique).

- à 4 semaines d'âge : 10 souris par groupe expérimental sont étudiés. L'administration des souches bactériennes *L. plantarum WJL* et *L. plantarum NIZO2877* a débuté en même temps que la mise des animaux sous régimes alimentaires, standard et hypercalorique. L'administration des bactéries par voie orale est effectuée 5 fois par semaine avec 10^9 CFU/souris/jour pour une durée totale de 10 semaines. Les souris contrôles ne recevant pas les bactéries sont gavées avec l'excipient (solution saline).

- à 3 semaines post-gavage : les souris sont caractérisées métaboliquement grâce à une mesure de la glycémie après 6 heures de jeûne. La mesure est effectuée par un prélèvement d'une goutte de sang à la queue et en utilisant un lecteur de glycémie. Un test de tolérance au glucose est également réalisé sur ces souris dans le but de mesurer la capacité des animaux à stocker plus ou moins le glucose circulant suite à une injection par voie intrapéritonéale de ce dernier. Les souris sont mises à jeun pendant 6 heures. La glycémie est mesurée à temps zéro, ensuite les animaux sont injectés avec du glucose (2g/kg) par voie intrapéritonéale et différentes mesures de glycémie sont réalisée à différents temps (15, 30, 60 et 90 minutes post-injection) pendant l'expérimentation.

- à 9 et 10 semaines post-gavage : les souris sont caractérisées à nouveau métaboliquement en utilisant les mêmes approches décrites précédemment (glycémie à jeun et test de tolérance au glucose). Cependant, un test de tolérance au pyruvate est réalisé dans le but d'observer la fonction hépatique qui est dérégulée par le régime hypercalorique. Comme décrit pour le test de tolérance au glucose, le test de tolérance au pyruvate consiste à injecter du pyruvate (1,5g/kg) par voie intrapéritonéale. Le taux de glucose est mesuré à temps 0, 15, 30, 60 et 90 min.

- à la fin de la semaine 10 post-gavage : les animaux sont sacrifiés et les différents tissus sont collectés afin de réaliser des expériences plus approfondis comme des dosages sériques dans le sang (insuline). Le dosage de l'insuline est réalisé sur du plasma pur (souris standard) ou dilué au ¼ (souris mises sous régime hypercalorique) en utilisant des kits ELISA commerciaux spécifiques pour la détection de l'insuline en suivant les instructions du fabricant.

La souche de bactérie lactique étant considérée comme répondant positivement au test si la glycémie et l'insuline à jeun ainsi que les tests métaboliques sont significativement inférieurs aux groupes contrôles correspondant (souris recevant l'excipient), avec une valeur de probabilité d'erreur p inférieure à 0,05 dans le test Mann-Whitney.

Résultats obtenus avec les souches *L. plantarum WJL* et *L. plantarum NIZO2877,* et un contrôle non-traités :

Tableau 2A : données brutes Figure 2A

SCD-PBS	SCD-WJL	SCD-#2877
100	81	105
93	102	110
108	117	123
110	97	98
110	92	102
107	88	105
125	91	107
101	85	99
125	116	108
105	100	110

	SCD-PBS	SCD-WJL	SCD-#2877	Analyse statistique			
				WJL vs. PBS		WJL vs. #2877	
Moyenne	108,4	96,9	106,7	Valeur de p	Significativité	Valeur de p	Significativité
Ecart-type	7,3	9,5	4,9				
Nb	10	10	10	<0,05	*	<0,05	*

Tableau 2B : données brutes Figure 2B

Temps (min)	T0	T15	T30	T45	T60	T90
SCD-PBS	100	223,7	164,0	139,5	132,5	108,8
	100	278,8	176,3	161,9	163,6	137,3
	100	338,1	178,8	188,1	179,7	129,7
	100	256,8	145,5	135,6	122,0	113,6
	100	224,1	179,3	178,4	163,8	135,3
SCD-WJL	100	201,8	151,3	147,8	136,3	131,9
	100	201,9	147,2	148,1	139,8	125,9
	100	182,8	143,3	117,9	121,6	111,9
	100	237,9	173,3	158,6	136,2	122,4

	100	178,2	127,2	123,1	119,0	112,2

SCD-#2877	100	255,8	167,3	153,1	144,2	115,9
	100	231,1	169,7	139,3	145,1	119,7
	100	181,7	171,4	134,1	162,7	146,8
	100	295,5	158,0	170,5	161,6	126,8
	100	226,9	162,0	153,7	136,1	125,9

		T0	T15	T30	T45	T60	T90
SCD-PBS	Moyenne	100	264,3	168,8	160,7	152,3	124,9
	Ecart-type	0	35,3	11,2	18,5	20,1	11,0
	Nb	10	5	5	5	5	5
SCD-WJL	Moyenne	100	200,5	148,5	139,1	130,6	120,9
	Ecart-type	0	16,0	11,1	14,9	8,2	7,0
	Nb	10	5	5	5	5	5
SCD-#2877	Moyenne	100	238,2	165,7	150,2	149,9	127,0
	Ecart-type	0	29,9	4,5	10,7	9,8	7,9
	Nb	10	5	5	5	5	5

Tableau 2C : données brutes Figure 2C

SCD-PBS	SCD-WJL	SCD-#2877
5017,5	4800	6120
8100	4507,5	6322,5
9652,5	4080	6825
5595	5962,5	7267,5
7065	3735	5152,5

	SCD-PBS	SCD-WJL	SCD-#2877	Analyse statistique			
				WJL vs. PBS			PBS vs. #2877
Moyenne	7086	4617	6337				
Ecart-type	1432,2	611,4	567	Valeur de p	Significativité	Valeur de p	Significativité
Nb	5	5	5	<0,01	**	n/a	n/a

Tableau 3A : données brutes Figure 3A

SCD-PBS	HCD-PBS	HCD-WJL
155	182	156
128	177	155
122	155	148
120	165	164

107	167	141
148	168	157
143	174	157
146	165	187
132	183	150
139		131

	SCD-PBS	HCD-PBS	HCD-WJL	Analyse statistique			
Moyenne	134	170,7	154,6	HCD-PBS vs. SCD-PBS		HCD-WJL vs. HCD-PBS	
Ecart-type	12,2	7,4	9,7	Valeur de p	Significativité	Valeur de p	Significativité
Nb	10	9	10	<0,0001	****	<0,01	**

Tableau 3B: données brutes Figure 3B

Temps (min)	T0	T15	T30	T60	T90
SCD-PBS	100	210,2	244,1	257,6	254,2
	100	157,8	161,7	176,6	145,3
	100	270,7	250,9	237,1	140,5
	100	299,3	197,1	183,2	139,4
	100	257,4	232,6	220,6	241,1
	100	468,6	295,2	219,0	182,9
	100	298,5	189,6	180,6	153,7
	100	256,2	158,7	162,8	91,7
	100	261,5	190,4	160,9	112,2
	100	237,9	124,8	118,0	99,4
HCD-PBS	100	275,6	257,6	243,3	227,6
	100	331,5	332,2	388,6	356,4
	100	296,1	310,5	331,5	330,4
	100	296,1	323,8	331,5	298,9
	100	284,4	284,4	284,4	257,8
	100	315,0	346,8	493,6	279,2
	100	290,3	340,9	340,9	315,3
	100	230,8	230,8	230,8	230,8
	100	339,5	348,8	321,5	305,2
	100	274,0	274,0	274,0	274,0
HCD-WJL	100	285,9	268,4	239,0	220,9
	100	209,7	259,7	233,1	216,2
	100	297,1	263,4	191,4	182,9
	100	300,0	317,4	266,3	243,8
	100	277,6	214,4	207,5	204,0
	100	374,2	297,5	289,3	278,0

	100	262,9	247,1	242,4	241,2
	100	342,9	264,6	258,9	248,0
	100	304,2	249,7	243,6	242,4
	100	245,3	198,8	186,3	178,9

		T0	T15	T30	T60	T90
SCD-PBS	Moyenne	100	271,8	204,5	191,6	156,1
	Ecart-type	0	50,2	41,0	33,6	42,0
	Nb	10	10	10	10	10
HCD-PBS	Moyenne	100	290,1	302,2	321,7	285,3
	Ecart-type	0	25,6	38,0	55,5	36,0
	Nb	10	10	10	10	10
HCD-WJL	Moyenne	100	290,0	258,1	235,8	225,6
	Ecart-type	0	33,7	24,5	25,0	25,1
	Nb	10	10	10	10	10

Tableau 3C: données brutes Figures 3C

SCD-PBS	HCD-PBS	HCD-WJL
16614,4	16624,4	16457,6
7060,5	29375,8	14717,5
13338,4	25006,9	13234,3
10100,4	24360,5	19689,6
15005,3	19944,3	13194,0
17764,3	31868,5	22415,1
10231,3	25576,7	16394,1
6241,7	14711,5	18934,3
7562,5	25316,9	17168,2
3419,3	19571,9	10653,7

	SCD-PBS	HCD-PBS	HCD-WJL	Analyse statistique			
				HCD-PBS vs. SCD-PBS		HCD-WJL vs. HCD-PBS	
Moyenne	10733,8	23235,7	16285,8				
Ecart-type	3957,4	4418,2	2668,8	Valeur de p	Significativité	Valeur de p	Significativité
Nb	10	10	10	<0,001	***	<0,05	*

Tableau 3D: données brutes Figures 3D

Temps (min)	T0	T15	T30	T60	T90
SCD-PBS	83	87,0	83,0	103,0	90,0
	77	150,0	154,0	144,0	130,0

	88	144,0	165,0	188,0	186,0
	83	137,0	153,0	146,0	131,0
	99	157,0	175,0	175,0	115,0
	78	130,0	160,0	140,0	129,0
	109	149,0	151,0	171,0	137,0
	88	152,0	172,0	176,0	132,0
	96	145,0	166,0	174,0	159,0
	92	141,0	171,0	149,0	121,0

HCD-PBS	145	268,0	248,0	305,0	264,0
	107	199,0	220,0	248,0	200,0
	115	187,0	217,0	239,0	203,0
	98	170,0	184,0	241,0	209,0
	130	178,0	223,0	273,0	244,0
	126	224,0	265,0	169,0	195,0
	152	208,0	223,0	310,0	255,0
	177	231,0	286,0	272,0	245,0
	211	330,0	321,0	313,0	281,0

HCD-WJL	103	127,0	159,0	236,0	233,0
	100	155,0	170,0	207,0	200,0
	98	114,0	136,0	154,0	148,0
	121	207,0	188,0	192,0	183,0
	88	148,0	172,0	195,0	134,0
	116	133,0	168,0	171,0	159,0
	107	161,0	204,0	214,0	224,0
	135	197,0	166,0	202,0	185,0
	142	198,0	222,0	285,0	227,0
	97	117,0	134,0	171,0	202,0

		T0	T15	T30	T60	T90
SCD-PBS	Moyenne	89,3	139,2	155	156,6	133
	Ecart-type	7,76	12,72	15,8	20,2	16,6
	Nb	10	10	10	10	10

HCD-PBS	Moyenne	140,1	221,7	243,0	263,3	232,9
	Ecart-type	27,7	37,0	32,9	34,7	27,7
	Nb	10	10	10	10	10

HCD-WJL	Moyenne	110,7	155,7	171,9	202,7	189,5
	Ecart-type	14,2	28,0	19,7	26,2	27,7

	Nb	10	10	10	10	10

Tableau 3E: données brutes Figures 3E

SCD-PBS	HCD-PBS	HCD-WJL
1170	14932,5	11505
7432,5	13057,5	10215
10012,5	11595	5115
6660	12780	7852,5
6480	12667,5	8985
6945	8602,5	5190
5175	12637,5	11317,5
8130	9577,5	6142,5
7710	10950	11625
5947,5		7612,5

	SCD-PBS	HCD-PBS	HCD-WJL	Analyse statistique			
				HCD-PBS vs. SCD-PBS		HCD-WJL vs. HCD-PBS	
Moyenne	6566,3	11981,3	8556,0				
Ecart-type	1498,5	1542,2	2173,5	Valeur de p	Significativité	Valeur de p	Significativité
Nb	10	9	10	<0,001	***	<0,001	***

Tableau 3F: données brutes Figures 3F

SCD-PBS	HCD-PBS	HCD-WJL
0,70	3,97	1,73
0,25	5,34	2,09
0,25	1,49	3,84
0,62	1,82	1,36
0,61	2,55	0,47
0,63	9,12	1,51
0,15	2,91	3,44
0,47	5,41	4,36
1,04		1,13
0,29		

	SCD-PBS	HCD-PBS	HCD-WJL	Analyse statistique			
				HCD-PBS vs. SCD-PBS		HCD-WJL vs. HCD-PBS	
Moyenne	0,5	4,1	2,2				
Ecart-type	0,2	1,9	1,1	Valeur de p	Significativité	Valeur de p	Significativité
Nb	10	8	9	<0,001	***	<0,05	*

Chez la souris conventionnelle sous régime alimentaire normal 4 semaines de traitement avec la souche *L. plantarum*^{WJL} améliore la glycémie à jeun et dès 9 semaines de traitement la tolérance au glucose.

Chez la souris conventionnelle sous régime alimentaire riche en calories, 9 semaines d'administration de la souche *L. plantarum*^{WJL} améliore de manière prononcée la glycémie à jeun, la tolérance au glucose, la tolérance au pyruvate et l'insulinémie à jeun ce qui démontre des propriétés fonctionnelles marquées de cette souche sur le métabolisme du glucose.

Exemple 3 : Des souches sont disponibles à l'ATCC, à l'Institut Pasteur de Paris, à l'Institut Pasteur de Lille ou publié dans la littérature scientifique et disponible auprès des chercheurs référents des publications mentionnées :

	Collection publique et/ou publication avec séquence du génome
Lactobacillus plantarum WJL	Kim et al., Genome Announc. 21 novembre 2013, 1(6).Pil : e00937-13
Lactobacillus plantarum NIZO2877	NIZO (2877)
Lactobacillus casei ATCC 393	ATCC (393)
Lactobacillus fermentum ATCC 9338	ATCC (9338)
Lactobacillus fermentum KLD	Institut Pasteur de Lille (A5.20)
Lactobacillus fermentum LMG	Institut Pasteur de Lille (A5.16)
Lactobacillus paracasei ATCC 25302	ATCC (25302)
Lactobacillus paracasei BL23	Institut Pasteur de Lille (A3.6) et Mazé et al., J. Bacteriol., Mai 2010; 192(10) :2647-8
Lactobacillus paracasei Shirota	Institut Pasteur de Lille (A3.5)
Lactobacillus delbrueckii spp.bulgaricus	ATCC (11842) et van de Guchte M, et al., Proc.Natl Acad Sci USA 13 juin 2006
Lactobacillus casei L919	Koryszewska-Baginska A et al., Genome Announc, 26 septembre 2013
Lactobacillus rhamnosus L900	Aleksandrzak-Piekarczyk T et al. Genome Announc , 15 août 2013
Lactobacillus rhamnosus L908	Koryszewska-Baginska A et al. Genome Announc, 20 février 2014
Lactobacillus rhamnosus GG	ATCC (53103) et Kankainen M et al., Proc Natl Acad Sci USA, 6 octobre 2009
Lactobacillus plantarum G821	CNCM I-4979

Exemple 4 (figures 4 et 5)

Les adaptations métaboliques de l'organisme induites par Lp^{wjl} impliquent l'augmentation de la production d'insuline et de la taille des îlots pancréatiques chez la souris conventionnelle.

Afin d'investiguer les adaptations métaboliques induites par Lp^{wjl} , des souris conventionnelles C57BL/6 ont été nourries avec un régime alimentaire standard supplémenté quotidiennement par l'administration orale de 109 CFUs de Lp^{wjl}.

Le traitement ne modifie pas l'évolution de la masse corporelle et ne modifie pas la prise alimentaire dans ces conditions nutritionnelles optimales (données non présentées). Cependant, après 10 semaines, alors que la glycémie est maintenue à un niveau normal (données non présentées), l'insulinémie à jeun est plus élevée (données non présentées), et le test de la tolérance au glucose intrapéritonéal révèle une meilleure tolérance au glucose chez les souris traitées au Lp^{wjl} (données non présentées). Ces effets ne sont pas observés quand la souche $Lp^{NIZ02877}$ est administrées (données non présentées). Ces observations démontrent donc l'action souche-spécifique de Lp^{wjl} sur le métabolisme hôte.

Les concentrations augmentées d'insuline chez les souris sous régime standard suggère un effet du traitement sur la sécrétion d'insuline par les cellules beta pancréatiques. L'analyse des îlots pancréatiques des animaux révèlent un fort impact de l'administration de Lp^{wjl} sur la taille moyenne des îlots (figure 4) avec l'augmentation du nombre d'îlots larges ou moyens et une réduction du nombre de petits îlots (figure 4). En accord avec le manque d'effet sur la tolérance au glucose et sur l'insulinémie, l'administration de $Lp^{NIZ02877}$ ne modifie pas la taille des îlots (figure 4). L'immunodétection des hormones pancréatiques démontre que l'augmentation de la taille des îlots n'est pas associée avec des changements observables dans l'organisation des îlots ou dans le ratio insuline/glucagon (données non présentées).

Puisque Lp^{wjl} était précédemment montré pour maintenir l'activité de l'axe GH/IGF1 grâce à son activité de promotion de la croissance en conditions de sous-nutrition chronique, les inventeurs ont évalué si l'augmentation de la taille des îlots pancréatiques était due à une stimulation par des hormones somatotropiques. Ni le niveau D'IGF1 sérique ni l'expression des récepteurs d'IGF1 et GH ou de leurs médiateurs classiques (SOCS2 et 3) dans les îlots n'est affecté chez les souris traitées au Lp^{wjl} (données non présentées), ce qui suggère qu'un autre mécanisme contribue à l'agrandissement de la taille des îlots.

La fonction du pancréas de sécréter l'insuline a été ensuite évaluée in vivo par le test oral au glucose et ex vivo en utilisant des îlots isolés (données non présentées). Pour les deux expériences, le traitement avec Lp^{wjl} améliore significativement la sécrétion d'insuline après le test au glucose, ce qui suggère une sensibilité augmentée des îlots à l'effet sécrétoire des îlots. En conclusion, l'augmentation de la taille des îlots et la réponse améliorée au test oral du glucose suggère une stimulation de l'axe incrétine intestin-pancréas chez les souris traitées au Lp^{wjl}.

Lp^{wjl} augmente la sécrétion de GLP1 et le nombre de cellules produisant de l'intestin

Afin d'évaluer l'axe incrétine pancréas-intestin, les inventeurs ont mesuré la production de GLP1 dans le sang de la veine porte 15 minutes après la charge orale de glucose, un test qui double significativement la production de GLP1 chez les souris contrôle (données non présentées). De manière importante, quand les souris sont traitées avec Lp^{wjl}, une augmentation de quatre à cinq fois du niveau de GLP1 dans la veine porte est déjà observée dans des conditions basales et reste élevée, bien qu'il ne soit pas plus augmenté, en réponse au glucose (données non présentées). Ce résultat suggère une capacité augmentée marquée de produire GLP1 chez les souris traitées avec Lp^{wjl}. Cette caractéristique est radicalement moins prononcée, en particulier en condition basale, sous administration de $Lp^{NIZ02877}$ (données non présentées). En lien avec ces observations, le nombre de cellules L produisant GLP1 est significativement plus élevé dans l'iléon des souris traitées avec Lp^{wjl}, mais pas des souris traitées avec $Lp^{NIZ02877}$ (figure 5). Les traitements n'affectent pas l'organisation de la barrière intestinale, comme évalué par examen histologique de la crypte et des villosités de l'iléon (données non présentées). Des résultats similaires sont retrouvés dans le colon des animaux, avec une augmentation du nombre de cellules GLP1 positives et un aspect normal de l'histologie du colon, quoique avec une augmentation visible de la longueur de la crypte du colon sous traitement Lp^{wjl} (données non présentées).

Afin d'évaluer si la production augmentée de GLP1 observée et la concentration dans la veine porte en présence de Lp^{wjl} contribue directement à la tolerance au glucose améliorée des animaux, les inventeurs ont utilisé Exendin-9-39, un inhibiteur bien caractérisé du récepteur de GLP1. Comme attendu, l'infusion d'Exendi-9-39 avant le test oral de la tolérance au glucose altère significativement la tolérance au glucose, mis en évidence par une augmentation de l'aire sous les courbes du test (données non présentées). L'effet est plus prononcé chez les souris traitées avec $Lp^{NIZ02877}$, comme évalué par les valeurs delta AUC (données non présentées). Cette

observation indique clairement que la tolérance au glucose améliorée des souris traitées avec Lp^{wjl} est dépendante en grande partie de l'augmentation du niveau de GLP1 et de l'axe incrétine intestin-pancréas amélioré.

5

Revendications

1. Composition comprenant au moins une souche de *Lactobacillus plantarum, Lactobacillus fermentum, Lactobacillus casei, Lactobacillus rhamnosus*, pour utilisation pour diminuer, ou ralentir la progression, des maladies métaboliques.

2. Composition pour utilisation pour diminuer, ou ralentir la progression, des maladies métaboliques selon la revendication 1, dans laquelle la maladie métabolique est le diabète de type 2.

3. Composition selon la revendication 1, dans laquelle *L. plantarum* est *L. plantarum* WJL ou *L. plantarum* NIZO2877.

4. Méthode de criblage de bactéries à tropisme intestinal chez un mammifère, susceptibles de diminuer, ou ralentir la progression, des maladies métaboliques, en particulier le diabète de type 2, dans lequel on monocolonise des larves de drosophiles initialement axéniques, par la souche de bactérie à tester, on élève ces larves avec un milieu nutritionnel hypercalorique, on mesure au moins un paramètre de maturation des larves, on détermine si la bactérie a eu un effet significativement favorable sur le paramètre de maturation, et l'on conclut le cas échéant que ladite souche a un effet favorable sur la maturation.

5. Méthode selon la revendication 4, dans laquelle on détermine si la bactérie conduit à un paramètre de maturation en amélioration significative par rapport à un contrôle constitué de larves axéniques élevées dans des conditions nutritionnelles similaires.

6. Méthode selon la revendication 4, dans laquelle on détermine si la bactérie conduit à un paramètre de maturation sensiblement égal ou amélioré par rapport à une référence constituée de larves monocolonisées par une souche de référence qui présente elle-même un paramètre de croissance en amélioration significative par rapport à un contrôle correspondant à des larves axéniques élevées dans des conditions nutritionnelles similaires.

7. Méthode selon l'une quelconque des revendications 4 à 6, dans laquelle on élève des embryons de drosophile axéniques sur un milieu nutritionnel, on les inocule avec la souche bactérienne à tester (les larves issues de ces embryons sont alors monoxéniques pour cette souche à tester), on mesure un paramètre de maturation des larves, et on compare les résultats obtenus avec les données obtenues avec des larves de drosophile axéniques élevées sur le même milieu nutritionnel (groupe contrôle) et/ou avec des larves de drosophile monoxéniques pour une souche de référence élevée sur le même milieu nutritionnel (groupe de référence).

8. Méthode selon l'une quelconque des revendications 4 à 7, dans laquelle à J0: on répartit des embryons en au moins 2 groupes sur du milieu nutritionnel

hypercalorique, comprenant notamment de la levure inactivée, de l'agar, de l'eau et du saccharose, dans des récipients adaptés, un premier groupe d'embryons est inoculé avec la souche bactérienne à tester (groupe monoxénique), le groupe formant le groupe axénique est inoculé avec un tampon salin stérile.

9. Méthode selon l'une quelconque des revendications 4 à 8, dans laquelle, une souche de bactérie ayant répondu positivement au test sur modèle drosophile est ensuite testée sur modèle mammifère, de préférence un modèle souris, possédant un microbiote normal, et recevant une nourriture riche en sucre et en lipides (régime hypercalorique), et l'on mesure un ou plusieurs paramètres choisis parmi mesure de glycémie sanguine, test de tolérance au glucose, test de tolérance au pyruvate, et on sélectionne une souche ayant apporté une amélioration de l'un de ces paramètres.

10. Méthode selon la revendication 9, dans laquelle on dispose d'un contrôle avec des souris possédant un microbiote entier et élevées avec accès libre à une nourriture de type standard.

11. Méthode selon l'une quelconque des revendications 4 à 10, dans laquelle on retient une souche de bactérie ayant conduit à un effet favorable sur le modèle drosophile et/ou sur le modèle mammifère, comme ayant un effet favorable sur la santé métabolique.

Figure 1:

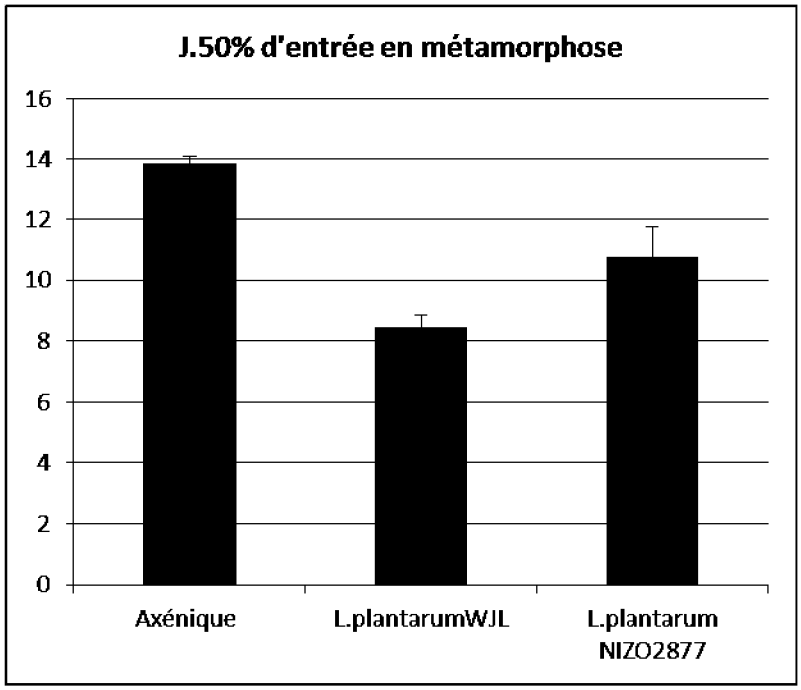


Figure 2A:

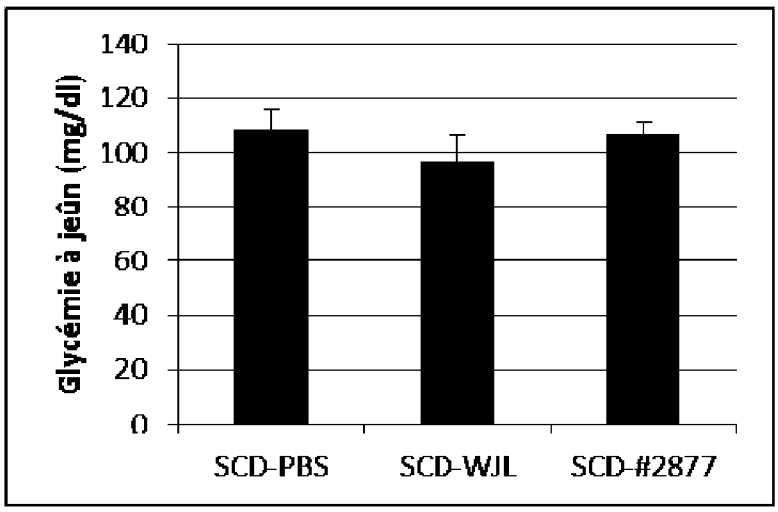


Figure 2B:

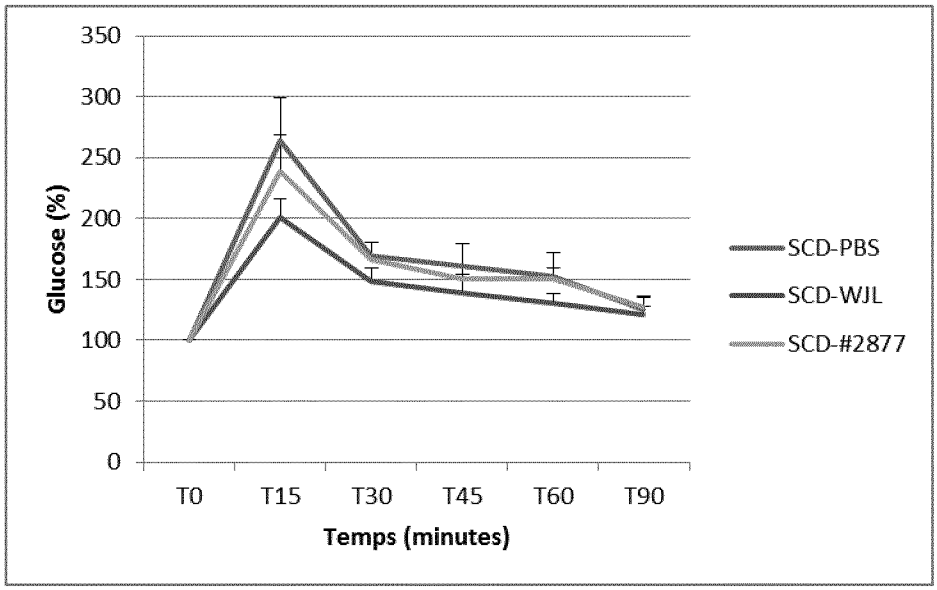


Figure 2C:

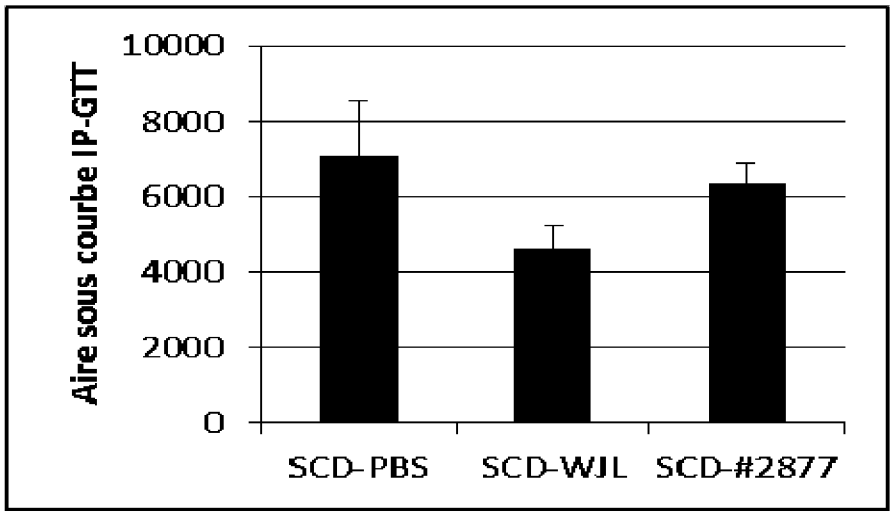


Figure 3A:

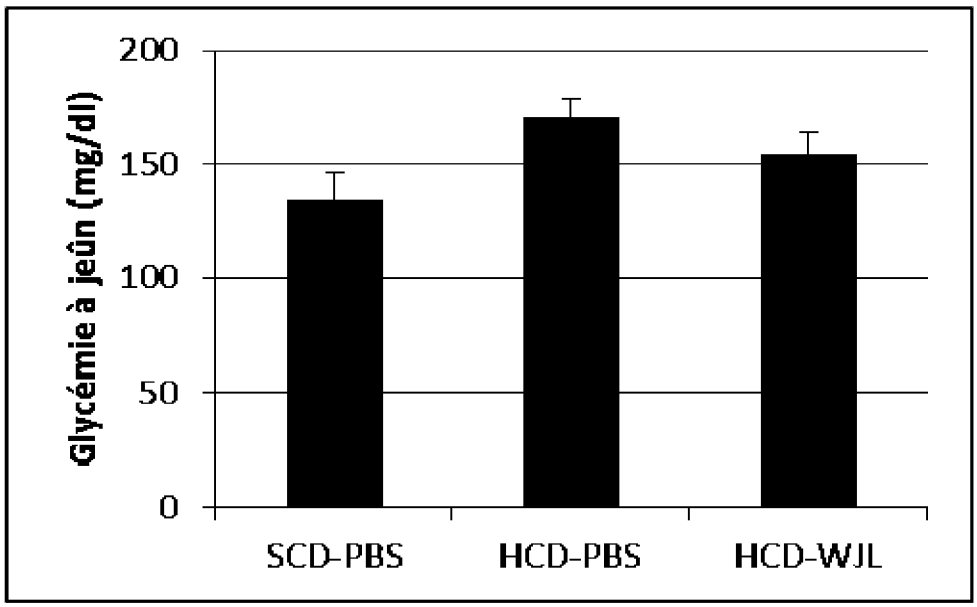


Figure 3B:

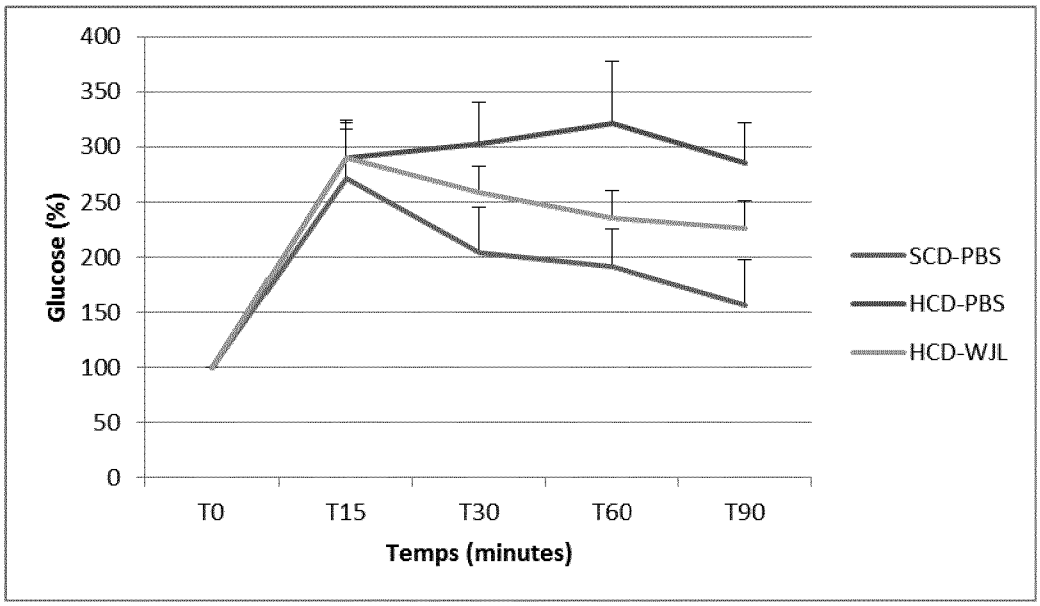


Figure 3C:

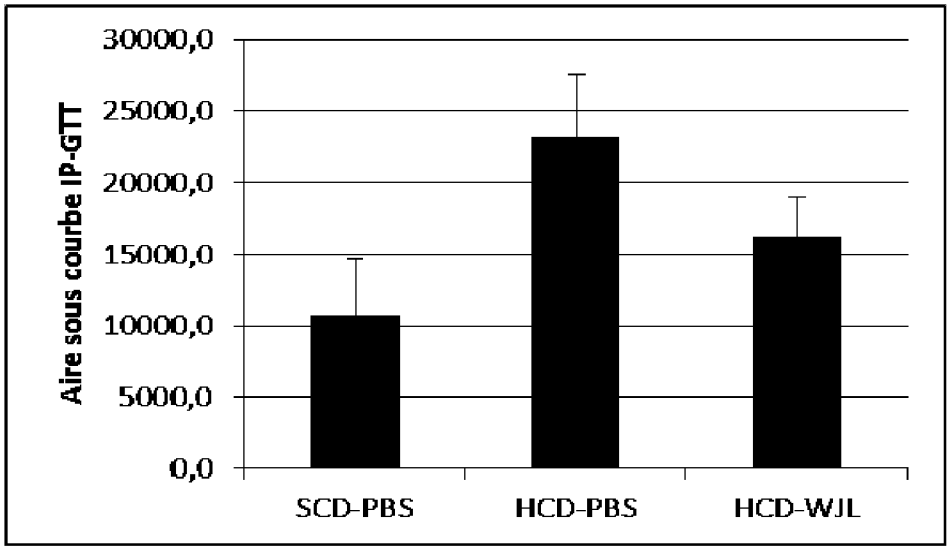


Figure 3D:

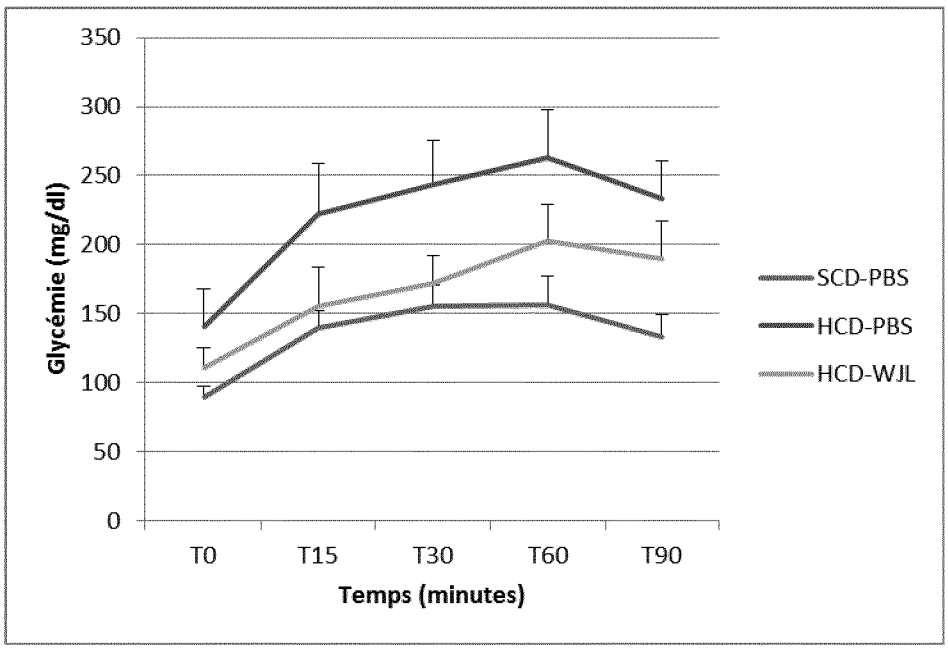


Figure 3E:

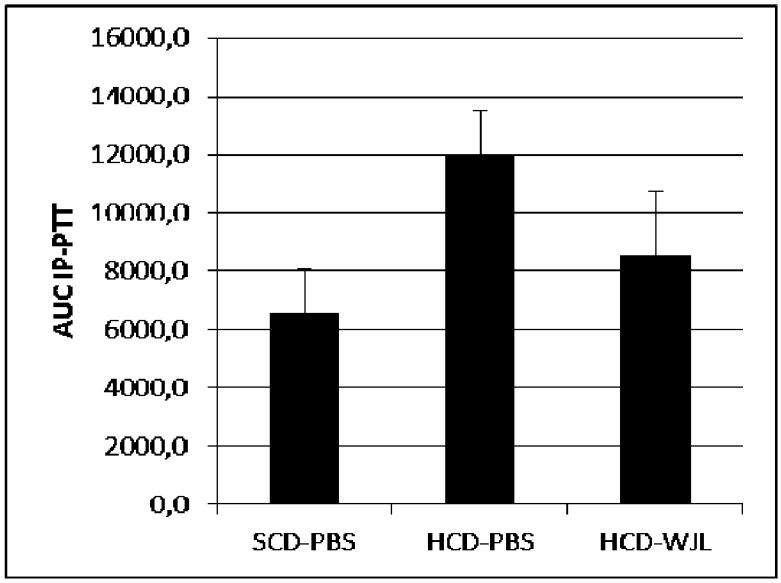


Figure 3F:

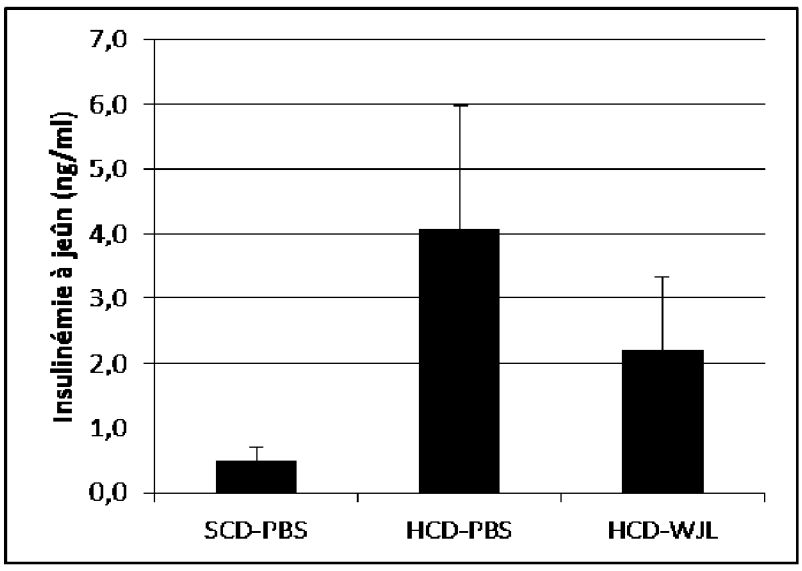


Figure 4A :

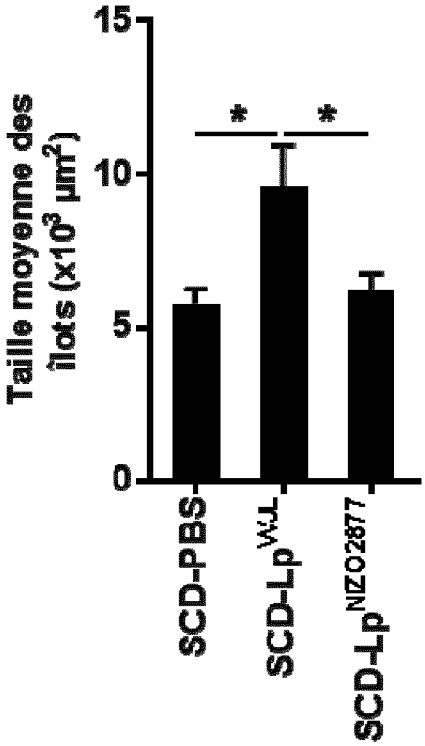


Figure 4B :

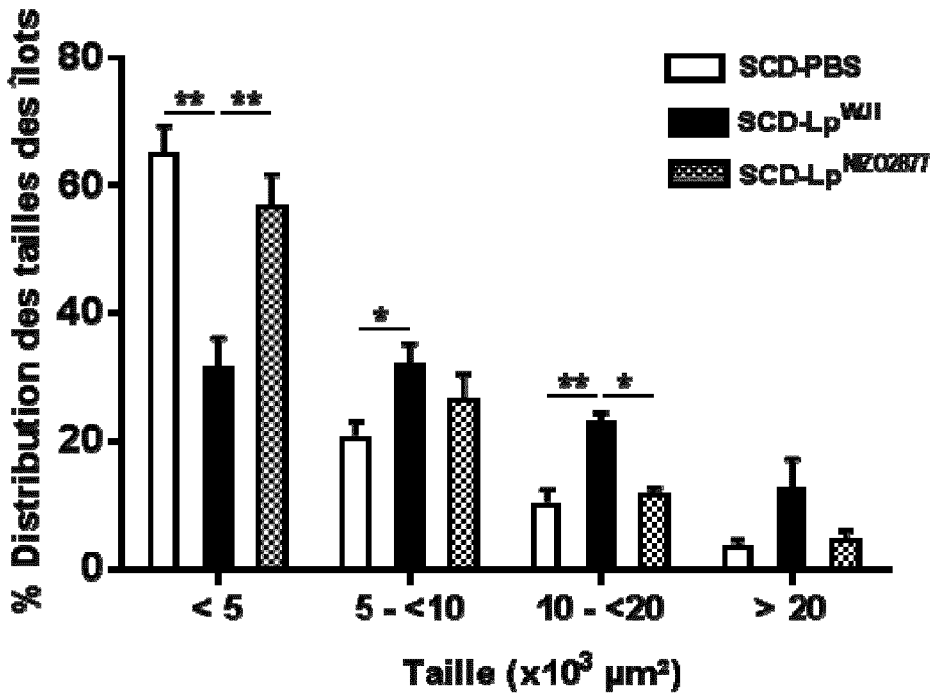
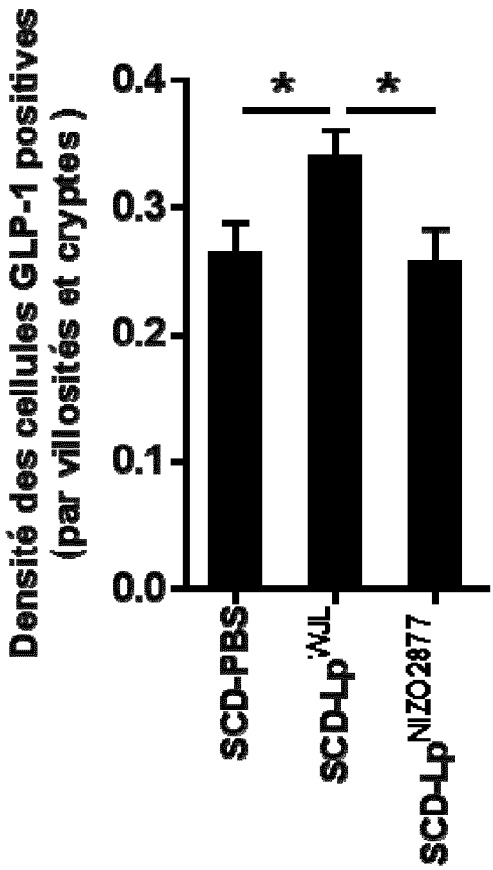


Figure 5 :


Densité des cellules GLP-1 positives
(par villosités et cryptes)
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
*
*
SCD-PBS
SCD-Lp^WJL
SCD-Lp^NIZO2877

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/081575

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12Q1/02 C12R1/25 A61K9/00 A61K35/747 C12R1/225
A23L33/135
ADD.
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12Q C12R A61K A23L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS, COMPENDEX, FSTA, INSPEC

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2016/070151 A1 (WHOLE BIOME INC [US]) 6 May 2016 (2016-05-06) the whole document abstract claims 1, 5, 8 -----	1-3
X	WO 2010/108950 A1 (CHR HANSEN AS [DK]; LESER THOMAS DYRMANN [DK]; GUNNARSSON THOMAS [SE];) 30 September 2010 (2010-09-30) the whole document abstract claims 1, 8 ----- -/--	1-3

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
11 January 2018	05/02/2018

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Gall-Truchot, A

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2015/173386 A1 (ECOLE NORM SUPERIEURE LYON [FR]; UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON 1 [FR]) 19 November 2015 (2015-11-19) cited in the application the whole document abstract page 1, line 12 - line 16 page 5, line 7 - line 34 example 1 claims 16-17	4-11
A	ERKOSAR B ET AL: "Host-intestinal microbiota mutualism: learning on the fly", CELL HOST & MICROBE, ELSEVIER, NL, vol. 13, no. 1, 1 January 2013 (2013-01-01), pages 8-14, XP002735354, ISSN: 1931-3128, DOI: 10.1016/J.CHOM.2012.12.004 [retrieved on 2013-01-16] the whole document abstract page 12, left-hand column, last paragraph page 12, right-hand column, paragraph 2 - page 13, left-hand column, paragraph 1 page 13, left-hand column, paragraph 2	4-11
A	GILLES STORELLI ET AL: "PromotesSystemic Growth by Modulating Hormonal Signals through TOR-Dependent Nutrient Sensing", CELL METABOLISM, CELL PRESS, UNITED STATES, vol. 14, no. 3, 14 July 2011 (2011-07-14), pages 403-414, XP028388621, ISSN: 1550-4131, DOI: 10.1016/J.CMET.2011.07.012 [retrieved on 2011-08-10] the whole document abstract page 404, left-hand column, paragraph 2 figure 1B page 405, right-hand column, paragraph 2 figure 3B page 412, left-hand column, paragraph 2	4-11

-/--

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/081575

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MATTHIEU Y. PASCO ET AL: "High Sugar-Induced Insulin Resistance in Drosophila Relies on the Lipocalin Neural Lazarillo", PLOS ONE, vol. 7, no. 5, 2 May 2012 (2012-05-02), page e36583, XP055398596, DOI: 10.1371/journal.pone.0036583 cited in the application the whole document abstract page 6, left-hand column, paragraph 2 page 6, right-hand column, paragraph 2 -----	4-11

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2017/081575

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2016070151 A1	06-05-2016	CA 2964480 A1	06-05-2016
		EP 3212001 A1	06-09-2017
		GB 2551642 A	27-12-2017
		JP 2017535597 A	30-11-2017
		SG 11201703395P A	30-05-2017
		US 2016228476 A1	11-08-2016
		US 2017020932 A1	26-01-2017
		US 2017027996 A1	02-02-2017
		WO 2016070151 A1	06-05-2016
WO 2010108950 A1	30-09-2010	CN 102448477 A	09-05-2012
		DK 2411027 T3	19-01-2015
		EP 2411027 A1	01-02-2012
		ES 2528602 T3	10-02-2015
		US 2012020944 A1	26-01-2012
		US 2013336942 A1	19-12-2013
		WO 2010108950 A1	30-09-2010
WO 2015173386 A1	19-11-2015	CN 106795482 A	31-05-2017
		EP 3164144 A1	10-05-2017
		FR 3020949 A1	20-11-2015
		US 2017080034 A1	23-03-2017
		WO 2015173386 A1	19-11-2015

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/EP2017/081575

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
INV. C12Q1/02 C12R1/25 A61K9/00 A61K35/747 C12R1/225
A23L33/135
ADD.
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
C12Q C12R A61K A23L

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS, COMPENDEX, FSTA, INSPEC

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 2016/070151 A1 (WHOLE BIOME INC [US]) 6 mai 2016 (2016-05-06) le document en entier abrégé revendications 1, 5, 8 -----	1-3
X	WO 2010/108950 A1 (CHR HANSEN AS [DK]; LESER THOMAS DYRMANN [DK]; GUNNARSSON THOMAS [SE];) 30 septembre 2010 (2010-09-30) le document en entier abrégé revendications 1, 8 ----- -/--	1-3

[X] Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

[X] Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
11 janvier 2018	05/02/2018

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Gall-Truchot, A

1

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 2015/173386 A1 (ECOLE NORM SUPERIEURE LYON [FR]; UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON 1 [FR]) 19 novembre 2015 (2015-11-19) cité dans la demande le document en entier abrégé page 1, ligne 12 - ligne 16 page 5, ligne 7 - ligne 34 exemple 1 revendications 16-17	4-11
A	ERKOSAR B ET AL: "Host-intestinal microbiota mutualism: learning on the fly", CELL HOST & MICROBE, ELSEVIER, NL, vol. 13, no. 1, 1 janvier 2013 (2013-01-01), pages 8-14, XP002735354, ISSN: 1931-3128, DOI: 10.1016/J.CHOM.2012.12.004 [extrait le 2013-01-16] le document en entier abrégé page 12, colonne de gauche, dernier alinéa page 12, colonne de droite, alinéa 2 - page 13, colonne de gauche, alinéa 1 page 13, colonne de gauche, alinéa 2	4-11
A	GILLES STORELLI ET AL: "PromotesSystemic Growth by Modulating Hormonal Signals through TOR-Dependent Nutrient Sensing", CELL METABOLISM, CELL PRESS, UNITED STATES, vol. 14, no. 3, 14 juillet 2011 (2011-07-14), pages 403-414, XP028388621, ISSN: 1550-4131, DOI: 10.1016/J.CMET.2011.07.012 [extrait le 2011-08-10] le document en entier abrégé page 404, colonne de gauche, alinéa 2 figure 1B page 405, colonne de droite, alinéa 2 figure 3B page 412, colonne de gauche, alinéa 2	4-11

-/--

1

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	MATTHIEU Y. PASCO ET AL: "High Sugar-Induced Insulin Resistance in Drosophila Relies on the Lipocalin Neural Lazarillo", PLOS ONE, vol. 7, no. 5, 2 mai 2012 (2012-05-02), page e36583, XP055398596, DOI: 10.1371/journal.pone.0036583 cité dans la demande le document en entier abrégé page 6, colonne de gauche, alinéa 2 page 6, colonne de droite, alinéa 2 -----	4-11

1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°
PCT/EP2017/081575

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2016070151 A1	06-05-2016	CA 2964480 A1	06-05-2016
		EP 3212001 A1	06-09-2017
		GB 2551642 A	27-12-2017
		JP 2017535597 A	30-11-2017
		SG 11201703395P A	30-05-2017
		US 2016228476 A1	11-08-2016
		US 2017020932 A1	26-01-2017
		US 2017027996 A1	02-02-2017
		WO 2016070151 A1	06-05-2016
WO 2010108950 A1	30-09-2010	CN 102448477 A	09-05-2012
		DK 2411027 T3	19-01-2015
		EP 2411027 A1	01-02-2012
		ES 2528602 T3	10-02-2015
		US 2012020944 A1	26-01-2012
		US 2013336942 A1	19-12-2013
		WO 2010108950 A1	30-09-2010
WO 2015173386 A1	19-11-2015	CN 106795482 A	31-05-2017
		EP 3164144 A1	10-05-2017
		FR 3020949 A1	20-11-2015
		US 2017080034 A1	23-03-2017
		WO 2015173386 A1	19-11-2015