

(12) DEMANDE DE BREVET D'INVENTION BELGE

(41) Date de publication : 10/06/2022

(21) Numéro de demande : BE2020/5828

(22) Date de dépôt : 16/11/2020

(62) Divisée de la demande de base :

(62) Date de dépôt demande de base :

(51) Classification internationale : A23K 10/18, A23K 20/163, A23K 50/30, A23L 33/135, A23K 50/60, A23L 33/21, A23L 33/00, A61K 31/702, A61K 31/733, A61K 35/741, A61K 35/742, A61K 35/745

(30) Données de priorité :

(71) Demandeur(s) :

ARTECHNO

SA
5032, ISNES
Belgique

AVEVE Biochem

BV
2170, MERKSEM
Belgique

DUMOULIN

SRL
5300, ANDENNE
Belgique

LE CENTRE WALLON DE RECHERCHES AGRONOMIQUES

Autre forme de société de droit public
5030, SAUVENIERE
Belgique

UNIVERSITE DE LIEGE

Université
4000, LIEGE
Belgique

VESALE PHARMACEUTICA

SA
5310, EGHEZEE
Belgique

(72) Inventeur(s) :

AREVALO SUREDA Ester

4000 LIEGE
Belgique

DELCENSERIE Véronique
4000 LIEGE
Belgique

EVERAERT Nadia
4000 LIEGE
Belgique

LIENART van LIDTH de JEUDE Jehan
9638 POMMERLOCH
Luxembourg

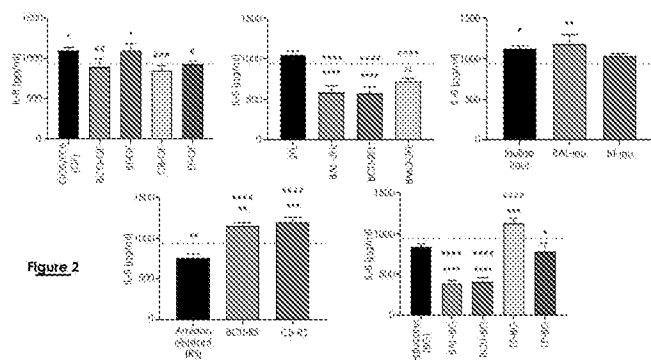
MARTINEZ Elisa
4000 LIEGE
Belgique

SABRI Ahmed
4031 ANGLEUR
Belgique

THONART Philippe
5081 LA BRUYERE
Belgique

(54) DÉVELOPPEMENT D'UNE COMPOSITION SYMBIOTIQUE COMME UN ADDITIF D'ALIMENTATION POUR LES PORCELETS OU LES TRUIES GESTANTES POUR MODULER LE MICROBIOTE INTestinal DES PORCELETS AU TEMPS DU SEVRAGE

(57)Composition symbiotique administrable à l'animal, en particulier au mammifère, en particulier au porc, en particulier de l'animal en gestation et au nouveau-né, en particulier à la truie en gestation ou non et au porcelet comprenant au moins un probiotique et au moins un prébiotique pour le traitement ou la prévention de la dysbiose, caractérisée en ce que ledit au moins un probiotique et ledit au moins un prébiotique sont choisis de telle manière qu'ils génèrent ensemble un environnement anti-inflammatoire dans l'intestin dudit animal.



**DÉVELOPPEMENT D'UNE COMPOSITION SYMBIOTIQUE COMME UN ADDITIF
D'ALIMENTATION POUR LES PORCELETS OU LES TRUIES GESTANTES POUR MODULER
LE MICROBIOTE INTESTINAL DES PORCELETS AU TEMPS DU SEVRAGE**

La présente invention se rapporte à une composition symbiotique administrable à l'animal, en particulier au mammifère, en particulier au porc, de préférence à l'animal en gestation et au nouveau-né, en particulier à la truie en gestation ou non et au porcelet comprenant au moins un probiotique et au moins un prébiotique pour le traitement ou la prévention de la dysbiose intestinale, ladite composition étant administrée dans le but d'améliorer les conditions de santé du nouveau-né.

La dysbiose intestinale est un déséquilibre du microbiote intestinal pouvant générer une prolifération de pathogènes (par ex *E. coli*) provoquant la diarrhée. Le microbiote est, quant à lui, défini comme l'ensemble des microorganismes présents dans un milieu déterminé (définition de l'office québécois de la langue française, 2008). Ce milieu déterminé est appelé microbiome. Le déséquilibre du microbiote intestinal se traduit par une réduction de la diversité des populations bactériennes et par un excès des bactéries pathogènes du microbiote. A l'inverse un microbiote équilibré dans la répartition des espèces de microorganismes qui le composent est dit en eubiose.

Le secteur de la production de viande grandit rapidement dans le monde, la production de porc augmente de manière régulière et représente l'un des plus gros consommateurs d'antibiotiques dans la production animale.

Dans les fermes porcines, le sevrage (interruption de l'allaitement et changement vers une alimentation sèche) est une période associée à un risque pour les jeunes animaux. Une problématique

récurrente lors du sevrage des animaux est le risque accru de diarrhées résultant de la transition abrupte de régime alimentaire. Cette transition abrupte peut engendrer une dysbiose intestinale.

5 Les diarrhées peuvent entraîner une perte de poids, voire la mort du nouveau-né dans des cas graves. Le traitement de routine ainsi que les procédures de prophylaxie appliquées pour la diarrhée détectée juste après la naissance du porcelet sont souvent peu efficaces.

10 Cette période de transition génère par ailleurs chez l'animal, en particulier chez le porcelet, un stress significatif au niveau comportemental, nutritionnel et environnemental, responsable d'une forte réduction dans la consommation de nourriture.

15 Il est donc crucial de maîtriser ce risque de diarrhées car elles occasionnent une perte considérable pour les éleveurs puisqu'elles sont souvent associées à un taux de mortalité élevé, une perte de poids, un retard de croissance, et des coûts liés aux traitements.

20 Actuellement ce risque de diarrhées est maîtrisé par l'ajout d'additifs minéraux bactériostatiques (ZnO , CuSO_4) dans le régime des porcelets sevrés mais, au-delà de la résistance déjà observée à ces composés, la pratique d'ajout d'additifs minéraux bactériostatiques mène à des problèmes environnementaux (contamination des eaux par les minéraux lessivés et contenus dans les effluents d'élevage).

25 L'ajout d'antibiotiques thérapeutiques dans la nourriture des animaux autour du sevrage est également une pratique courante. Ce traitement reste problématique car il induit la résistance des bactéries aux antibiotiques. Chez les animaux d'élevage, une utilisation aveugle d'antibiotiques peut également favoriser la dysbiose intestinale. De plus, sachant que la résistance aux antibiotiques augmente de plus en plus et en particulier chez les animaux d'élevage, la commission européenne a

interdit depuis le 1^{er} janvier 2006 l'utilisation des antibiotiques comme facteurs de croissance dans les aliments pour animaux.

Compte tenu de la croissance de la démographie mondiale et de la demande croissante de viande dans le monde, il est donc crucial
5 de trouver des solutions alternatives à l'usage des antibiotiques et des additifs minéraux pour réduire l'incidence et la sévérité des problèmes digestifs chez les animaux sevrés et, de manière plus générale, pour soutenir une croissance durable de l'industrie de la viande.

Au vu de ce qui précède, des solutions alternatives aux
10 antibiotiques et minéraux bactériostatiques ont été développées impliquant une utilisation optimale de probiotiques en combinaison ou non avec des prébiotiques.

D'une manière générale, une combinaison d'au moins un probiotique avec au moins un prébiotique est appelée un symbiotique,
15 lorsque le prébiotique agit comme substrat en synergie avec le probiotique pour procurer un effet positif sur la santé, en particulier sur la digestion.

La digestion des protéines, des sucres et des graisses chez les individus monogastriques, et en particulier chez les porcs et la volaille,
20 repose d'abord sur une digestion s'effectuant au niveau de l'estomac qui constitue un environnement acide entraînant une dénaturation des macromolécules pour former un digesta. Le digesta arrive ensuite dans l'intestin et y subit encore une hydrolyse par action du suc pancréatique qui contient plusieurs protéases et par action des aminopeptidases et des
25 dipeptidases intestinales.

L'absorption des produits de ces hydrolyses a lieu dans la partie supérieure de l'intestin grêle et tous les produits non digérés dans

l'intestin grêle gagnent le gros intestin où ils sont soumis à l'action des microorganismes (microbiote intestinal) en entraînant une fermentation.

Il existe de nombreuses publications qui confirment le rôle indispensable du microbiote intestinal sur la santé des animaux (et des humains). Le microbiote intestinal interagit aussi de manière permanente avec le système immunitaire présent dans la paroi intestinale. Certaines études ont aussi démontré la capacité des probiotiques et/ou des prébiotiques à rééquilibrer le microbiote intestinal et leur utilité sur la santé intestinale par effets généralement directs et à court-terme.

L'Organisation mondiale de la Santé (OMS) et l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) ont définis les probiotiques comme étant 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* ». Il existe des définitions plus larges qui ne font pas référence à l'alimentation, et où le mot « ingérés » peut être remplacé par « administrés ».

Bien que les gens pensent souvent aux bactéries et autres micro-organismes comme des « germes » nocifs, beaucoup sont en fait utiles. Certaines bactéries aident à digérer les aliments, à détruire les cellules pathogènes ou à produire des vitamines. Beaucoup de micro-organismes dans les produits probiotiques sont les mêmes que ou similaires aux micro-organismes qui vivent naturellement, de manière endogène, dans notre corps.

Sans être exhaustif, les probiotiques comprennent différents microorganismes comme les bactéries *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *Bifidobacterium animalis lactis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bacillus licheniformis*, *Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium thermophilum*, *Clostridium butyricum*, *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium crudilactis*, *Bifidobacterium mongoliense*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus*

casei, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus johnsonii*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, *Collinsella tanakaei*, *Pediococcus acidilactici*, *Faecalibacterium prausnitzii*,
 5 *Coprococcus catus*, *Roseburia intestinalis*, *Anaerostipes butyraticus*. Les bactéries probiotiques les plus courantes étant celles du genre *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*. Les probiotiques comprennent également des levures comme *Saccharomyces boulardii* (Sanders M.E., «*Probiotics, strains matter*», *Functional foods & nutraceuticals*
 10 *magazine*, 2007, 36–41).

Les prébiotiques, quant à eux, sont des substrats utilisés de manière sélective par les micro-organismes de l'hôte qui stimulent sélectivement la croissance ou l'activité de micro-organismes souhaitables (Expert consensus document: The International Scientific
 15 Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics, *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2017, 14, 491-502, <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>).

Sans être exhaustif, les prébiotiques comprennent entre
 20 autres l'inuline, le beta-glucane, le 2'-Fucosyllactose (2FL), des oligosaccharides comme les galactooligosaccharides (GOS), fructooligosaccharides (FOS), mannanoligosaccharide (MOS), xylooligosaccharide (XOS), acide gras polyinsaturés (polyunsaturated fatty acid: PUFA), acide linoléique conjugué (ALC).

25 Une formulation combinant au moins un probiotique en association avec au moins un prébiotique pour prévenir et traiter les infections bactériennes pouvant mener à la diarrhée, augmenter le poids de l'animal et promouvoir la croissance est connue du document WO2014049023. Le document WO2014049023 décrit des produits et

compositions pouvant être bénéfiques en élevage. Lesdits produits et compositions qui y sont décrites comprennent des microorganismes, tels que des bactéries, en particulier des bactéries probiotiques. Les souches, ainsi que les compositions les comprenant, peuvent être administrées à des animaux, de préférence à des animaux d'élevage, tels que les porcs. L'administration peut avoir lieu dans les premiers jours de vie. Selon ce document, l'administration des produits ou des compositions favorise la croissance animale et la prise de poids de l'animal. Les infections bactériennes peuvent également être prévenues ou traitées par lesdits composés ou compositions.

Le document WO2018002671 divulgue une composition pour le traitement et/ou la nutrition de volailles telles que des poulets de chair comprenant (i) un probiotique commensal choisi parmi *Bifidobacterium animalis*, *Collinsella tanakaei*, *Lactobacillus reuteri*, *Anaerostipes*, *Lactobacillus crispatus*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus pontis*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Coprococcus catus*, *Roseburia intestinalis*, *Anaerostipes butyraticus*, *Butyricicoccus*, *Lactobacillus johnsonii* et *Ruminococcus sp.*; et (ii) un prébiotique. Ce document divulgue également l'utilisation d'une telle composition pour le traitement des maladies entériques chez les volailles, telles que l'entérite nécrotique.

Le document WO2006133472A1 concerne un additif alimentaire et/ou additif pour l'eau potable animale ou humaine favorisant la santé ou la croissance de probiotiques. Ce document concerne en outre une utilisation de l'additif alimentaire humain et animal et/ou de l'eau potable, notamment pour la prévention de l'effet néfaste d'un certain nombre de germes indésirables dans le système digestif des animaux et/ou des oiseaux domestiques.

Finalement, le document WO2017156548A1 concerne certains aliments comprenant un composant nutritionnel fermentescible

et un composant probiotique, où le composant probiotique est sélectionné, sur la base de critères génétiques et/ou métaboliques, pour métaboliser spécifiquement tout monomère de sucre libre (Free Sugar Monomers (FSM)) ou tout acide aminé libre (Free Amino Acids (FAA)) ou peptide qui s'accumulent dans l'intestin grêle et le gros intestin en raison de la composante nutritionnelle fermentescible, qui, sans cette métabolisation seraient fermentés et métabolisés par des bactéries moins adaptées / opportunistes, créant des efflorescences de bactéries intestinales délétères et déplaçant le microbiome vers un potentiel état de dysbiose.

Malheureusement, les formulations connues sont essentiellement utilisées comme agent thérapeutique de dysbiose ou de déséquilibre du microbiome chez l'animal d'élevage. Les effets démontrés *in vivo* par ces formulations restent très généraux comme la prise de poids ou le pourcentage de mortalité de l'animal. De nombreux probiotiques sont décrits en association avec n'importe quel prébiotique dans des buts bien divers.

En outre, selon Barba-Vidal et col. *Animal*, 2018, 12, 2489-2498, DOI: 10.1017/S1751731118000873, il existe un manque criant de reproductibilité au niveau des expérimentations montrant l'effet bénéfique des probiotiques.

La présente invention vise donc à procurer une formulation symbiotique qui a un effet qui se maintient dans le temps en agissant spécifiquement sur la modulation du microbiote de manière précoce, favorisant ainsi une eubiose intestinale de manière fiable.

En effet, selon la présente invention, une composition symbiotique d'au moins un prébiotique et d'au moins un probiotique aurait non seulement un effet thérapeutique mais également un impact prophylactique sur la modulation du microbiote de l'hôte pour une action

à plus long terme. Il est en effet décrit par Nauta et col. AM. J. Clin. Nutr. 2013, 98 :586S-93S, DOI: 10.3945/ajcn.112.039644 que la modulation du microbiote grâce à une alimentation adaptée durant la gestation et juste après la naissance peut en effet favoriser la digestion, l'homéostasie métabolique et le développement immunologique.

Les interventions à la fin de la gestation de la truie et/ou dès la naissance du porcelet devraient permettre par le principe de la programmation précoce d'influencer de manière optimale et durable le bon développement du microbiote du nouveau-né. Par conséquent, les effets positifs pour la santé de l'animal ne seraient pas observés seulement en début de vie et durant les 3-4 semaines après le sevrage mais ils resteraient aussi observables au long de la vie adulte.

La première colonisation intestinale du porcelet par le microbiote maternel au moment de la mise bas est cruciale pour l'établissement d'un microbiote intestinal favorable du nouveau-né, mais la composition du microbiote peut être influencée par de nombreux facteurs tels que des antibiotiques, la nourriture, l'environnement, les agents infectieux, etc.

La présente invention entend donc pallier les inconvénients précités en procurant une composition telle qu'indiquée précédemment caractérisée en ce que ledit au moins un probiotique et ledit au moins un prébiotique sont choisis de telle manière qu'ils génèrent ensemble un environnement anti-inflammatoire dans l'estomac et/ou l'intestin dudit animal, en particulier du mammifère, en particulier du porc, de préférence de l'animal en gestation et du nouveau-né, en particulier de la truie en gestation ou non et du porcelet, dans le but d'améliorer les conditions de santé du nouveau-né.

Selon la présente invention, il a en effet été mis en évidence qu'il était possible de mettre à disposition une formulation symbiotique qui

génère de manière démontrée et reproductible un environnement anti-inflammatoire dans le système digestif, tant de l'animal en gestation que plus tard du nouveau-né, lequel se maintient dans le temps pour protéger l'animal contre des dysbioses ultérieures.

5 La formulation symbiotique selon la présente invention permettant de moduler le microbiote du fœtus dans un animal en gestation ou du nouveau-né permettra d'avoir un effet prophylactique maximal et assurera une croissance et un développement optimal de l'animal.

10 En effet, la formulation selon la présente invention favorise une flore intestinale saine qui protège ainsi l'animal qui l'ingère, en particulier lorsque celle-ci est ingérée par la femelle en gestation par la génération démontrée et reproductible d'un environnement anti-inflammatoire dans l'estomac et/ou l'intestin, et ce de manière
15 systématique.

 En effet, il est crucial d'analyser l'impact des probiotiques à travers 3 critères importants : la concentration en cellules viables, l'effet bénéfique sur la croissance de l'hôte et l'effet bénéfique sur le fonctionnement du tube digestif grâce notamment à un impact anti-
20 inflammatoire (Markowiak P. et Slizewska K., Gut Pathog. 2018, 10, 21, doi: 10.1186/s13099).

 La formulation symbiotique selon la présente invention procure une solution efficace contre la dysbiose et le problème de diarrhée survenant lors du sevrage, dont le probiotique et le prébiotique
25 sont choisis spécifiquement non pas uniquement sur la viabilité cellulaire, mais pour leurs effets associés sur la viabilité cellulaire et sur la réponse anti-inflammatoire du microbiote de l'hôte.

Il a en effet été démontré selon la présente invention que la formulation symbiotique contenant un probiotique et un prébiotique produit une diminution de la production d'IL-8 en test *in vitro*, et une augmentation des acides gras à courtes chaînes « *Short Chain Fatty Acids, SCFAs* » ainsi qu'une amélioration de la diversité et de la quantité des populations bactériennes endogènes comme les *Lactobacillus* et les *Bifidobacteria* ainsi que les bactéries intervenant dans les voies métaboliques de production du butyrate ou d'autres acides gras à chaînes courtes. Le probiotique et le prébiotique, ensemble, forment un microbiote intestinal équilibré, conduisant de cette manière à la génération ensemble d'un environnement anti-inflammatoire dans le système digestif de l'animal, en particulier du mammifère, en particulier du porc, de préférence de l'animal en gestation et du nouveau-né, en particulier de la truie en gestation ou non et du porcelet.

En effet, ces indicateurs sont importants car il a été montré qu'un environnement inflammatoire du tractus gastrointestinal peut générer une dysbiose intestinale (Zeng et col., *Mucosal Immunol.*, 2017, 10,18-26, doi: 10.1038/mi.2016.75). Il a également été montré que les « *Short Chain Fatty Acids, SCFA* » peuvent avoir additionnellement un effet bénéfique de régulateurs immunologiques sur l'environnement gastro-intestinal (Parada Venegas et col., *Frontiers in Immunology*, 2019, 10, doi:10.3389/fimmu.2019.00277). Les SCFAs sont des acides gras à courtes chaînes, produits par le processus de fermentation dans le colon. L'acétate, le propionate et le butyrate sont les trois principaux SCFAs. Le butyrate est particulièrement important pour le bon fonctionnement du colon car il est la source d'énergie principale des colonocytes (cellules épithéliales du colon). Les SCFAs peuvent également réduire la réponse pro-inflammatoire des cellules épithéliales de l'intestin (Iraporda C. et col., *Immunology*, 2015 10:1161-1169. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2015.06.004>).

Administrée à l'animal, en particulier au mammifère, en particulier au porc, de préférence à l'animal en gestation, et au nouveau-né, en particulier à la truie en gestation ou non et au porcelet, la formulation symbiotique selon la présente invention favorise
5 l'établissement d'un microbiote intestinal équilibré de manière très précoce, protégeant l'animal, le mammifère, le porc ou l'animal en gestation ou encore le nouveau-né, plus particulièrement la truie en gestation ou le porcelet de manière soutenue dans le temps contre la dysbiose par le probiotique et le prébiotique qu'elle contient, lesquels
10 génèrent ensemble un environnement anti-inflammatoire.

Dans une forme de réalisation préférentielle de la présente invention, ledit probiotique est choisi dans le groupe des bactéries *Bifidobacterium thermophilum*, *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium animalis lactis*, *Clostridium butyricum*, *Bifidobacterium crudilactis*.

15 Selon la présente invention, *Bifidobacterium thermophilum* provient de la Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM/LMG Gent) répertoriée sous le numéro 18892, *Enterococcus faecium* (LMG S-28935), *Bifidobacterium animalis lactis* est une souche déposée à la Belgian Coordinated Collections of Microorganisms
20 (BCCM/LMG Gent) ayant le numéro de dépôt LMG P-28149, *Clostridium butyricum* (LMG1217), *Bifidobacterium crudilactis* est une souche déposée à la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes (CNCM, Institut Pasteur) ayant le numéro de dépôt (CNCM I-3342) dans le cadre du document WO2006122850.

25 Dans une forme particulière de la présente invention, ledit prébiotique est choisi dans le groupe comprenant l'inuline, le β -glucane, 2'Fucosyllactose, GOS/FOS, l'amidon résistant.

De préférence, selon l'invention, ladite composition symbiotique est caractérisée en ce que ledit au moins un probiotique et

ledit au moins un prébiotique génèrent ensemble une augmentation des concentrations en populations bactériennes endogènes favorables au microbiote intestinal telles que les *Lactobacillus* et les *Bifidobacteria*. Avantageusement, cette augmentation des concentrations en populations bactériennes génère un meilleur équilibre du microbiote intestinal de l'hôte diminuant le risque de dysbiose intestinal.

Avantageusement, selon l'invention, ladite composition symbiotique est caractérisée, de préférence, en ce que ledit au moins un probiotique et ledit au moins un prébiotique génèrent ensemble une réduction de la concentration d'IL-8 d'au moins 10% formant ledit environnement anti-inflammatoire. Dans le cadre de la présente invention, la concentration d'IL-8 a été mesurée grâce à des tests *in vitro* sur des cellules IPEC_J2 en présence du jus de fermentation (contenant ou non la composition symbiotique à tester).

Avantageusement, selon l'invention, ladite composition symbiotique est caractérisée, de préférence, en ce que ledit au moins un probiotique et ledit au moins un prébiotique génèrent ensemble une stabilisation ou une augmentation de la sécrétion d'acides gras à courte chaîne (SCFA's) par le microbiote intestinal. Les SCFAs ont en effet un rôle bénéfique multiple au niveau de l'intestin : le butyrate, notamment, a un rôle régulateur dans le transport de fluide transépithélial. Il améliore également l'état oxydatif et l'inhibition de l'inflammation de la muqueuse de l'intestin, il renforce la barrière de défense épithéliale, il module la sensibilité viscérale et la mobilité intestinale (Canani, R.B. et col. World J. Gastroenterol., 2011, 17 : 1519-1528, doi: 10.3748/wjg.v17.i12.1519).

De préférence, selon l'invention, lesdits SCFAs sont choisis parmi le butyrate, le propionate, l'acétate, le lactate ou leurs combinaisons.

Dans le cadre de la présente invention, la production desdits SCFAs est mesurée grâce au modèle *in vitro* fermentation statique détaillé plus en détails ci-après.

De préférence, selon l'invention, la composition symbiotique
5 est caractérisée en ce que ledit au moins un probiotique et ledit au moins un prébiotique est choisi dans le groupe constitué de *Bifidobacterium thermophilum* et inuline, de *Bifidobacterium crudilactis* et beta-glucanes, de *Bifidobacterium animalis lactis* et 2'fucosyllactose, de *Clostridium butyricum* et GOS/FOS, *Enterococcus faecium* et beta-glucanes et leur
10 mélange.

En effet, selon la présente invention, une composition symbiotique comprenant *Bifidobacterium thermophilum* et inuline ou comprenant *Bifidobacterium crudilactis* et beta-glucanes, ou comprenant *Bifidobacterium animalis lactis* et 2'fucosyllactose ou
15 comprenant *Clostridium butyricum* et GOS/FOS ou encore comprenant *Enterococcus faecium* et beta-glucanes a montré une capacité synergique à créer un environnement anti-inflammatoire, en réduisant la présence d'IL-8, en augmentant la production d'acide gras à courtes chaînes et en favorisant la croissance des populations bactérienne
20 favorables au microbiote.

Avantageusement, selon l'invention, la composition symbiotique peut contenir plus de 1 probiotique, par exemple 2 probiotiques, ou par exemple 3 probiotiques, ou par exemple 4 probiotiques ou par exemple 5 probiotiques. Selon l'invention, la
25 composition symbiotique pourra également contenir plus de 1 prébiotique, par exemple 2 prébiotiques, ou par exemple 3 prébiotiques, ou par exemple 4 prébiotiques. Une composition symbiotique pouvant contenir une combinaison de plusieurs probiotiques et de plusieurs prébiotiques permet d'optimiser l'environnement anti-inflammatoire et

d'améliorer la production des indicateurs de croissance du microbiote tels que les SCFAs.

Avantageusement, selon l'invention, la composition symbiotique contient au moins 1 excipient conventionnel, et se présente
5 sous forme liquide ou solide.

La forme solide peut-être une poudre, une poudre dans une gélule, un granulé ou un comprimé ou une autre forme quelconque.

D'autres formes de réalisation de la composition symbiotique suivant l'invention sont indiquées dans les revendications annexées.

10 La présente invention se rapporte également à un complément alimentaire administrable à l'animal, en particulier au mammifère, en particulier au porc, de préférence à l'animal en gestation et au nouveau-né, en particulier à la truie en gestation ou non et au porcelet pour le traitement préventif et/ou curatif de la dysbiose
15 intestinale.

Ledit complément alimentaire, comprenant ladite composition, peut être sous forme liquide par exemple dans une base lactée ou huileuse ou sous forme solide comme une poudre, une poudre dans une gélule, un granulé ou un comprimé ou une autre forme
20 quelconque.

D'autres formes de réalisation du complément alimentaire suivant l'invention sont indiquées dans les revendications annexées.

La présente invention se rapporte en outre à un aliment complet ou complémentaire pour animaux d'élevage comprenant ladite
25 composition, ledit aliment étant sous forme de farine et/ou de granulés et/ou d'alimentations lactées et/ou toutes autres formes de conditionnement alimentaire.

D'autres formes de réalisation de l'aliment complet ou complémentaire pour animaux d'élevage suivant l'invention sont indiquées dans les revendications annexées

5 La présente invention se rapporte de plus à un aliment pour nouveau-né animal comprenant ladite composition selon la présente invention et une base lactée compatible avec l'alimentation du nouveau-né.

10 D'autres formes de réalisation de l'aliment pour nouveau-né animal suivant l'invention sont indiquées dans les revendications annexées.

La présente invention se rapporte enfin à une utilisation de ladite composition pour le traitement préventif et/ou curatif de la dysbiose intestinale de l'animal, en particulier du mammifère, en particulier du porc, de préférence de l'animal en gestation et du nouveau-né, en particulier de la truie en gestation ou non et du porcelet, comprenant au moins une administration de ladite composition à raison d'une quantité de prébiotique comprise entre 0,1 et 1000 g/jour/animal, préférentiellement entre 0.5 et 100 g/jour/animal, de manière avantageuse entre 1 et 25 g/jour/animal, d'une quantité de probiotique comprise entre 1.00E+05 et 1.00E+015 CFU/jour/animal, préférentiellement entre 1.00E+06 et 1.00E+013 CFU/jour/animal, de manière avantageuse entre 1.00E+07 et 1.00E+011 CFU/jour/animal et au moins une administration d'une ration alimentaire quotidienne, ledit probiotique et ledit prébiotique de la composition étant administrés de manière simultanée, séparée ou échelonnée dans le temps.

D'autres formes d'utilisation de ladite composition suivant l'invention sont indiquées dans les revendications annexées.

D'autres caractéristiques, détails et avantages de l'invention ressortiront de la description donnée ci-après, à titre non limitatif et en faisant référence aux dessins et aux exemples.

La figure 1 montre le schéma du dispositif expérimental du système BabySPIME (Dufourny S. et col. Journal of Microbiological Methods, 2019, 167: 105735. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019>). Compartiment 1 : Estomac/duodenum/jejunum, compartiment 2 : iléon, compartiment 3 : colon ascendant. A: Alimentation, B: probiotique, C: prébiotique.

La figure 2 illustre le niveau de production d'IL-8 (pg/ml) par des cellules IPEC-J2. Les cellules IPEC-J2 ont été mise en contact d'un jus de fermentation venant d'une fermentation avec uniquement un prébiotique, GOS/FOS (GF) ou Inuline (Inu) ou 2'FL (2FL) ou beta-glucane (BG) ou amidon résistant (RS), ou bien provenant d'une fermentation pendant laquelle une composition combinant un prébiotique et un probiotique selon l'invention a été testée. Les résultats montrent la moyenne du niveau de production d'IL-8 +/- l'écart-type. La ligne horizontale correspond au niveau d'IL-8 dans la condition contrôle (blanc-mucine). La signification statistique a été analysée par un test ANOVA unidirectionnel avec une comparaison multiple de type Dunnett de chaque prébiotique et symbiotique par rapport à la condition contrôle (indiqué par *), et entre les combinaisons symbiotiques et le prébiotique seul (indiqué par #). Lorsque $p < 0.05$: *, # ; lorsque $p < 0.01$: **, ## ; lorsque $p < 0.001$: ***, ### ; et lorsque $p < 0.0001$: ****, ####. BCO : *Bacillus coagulans*, BT : *Bifidobacterium thermophilum*, CB : *Clostridium butyricum*, EF : *Enterococcus faecium*, BAL : *Bifidobacterium animalis lactis*, BCU : *Bifidobacterium crudilactis*, BMO : *Bifidobacterium mongoliense*, LP : *Lactobacillus plantarum*.

La figure 3 montre une série temporelle indiquant l'accumulation de la production de gaz dans une fermentation *in vitro* en lot (fermentation statiques *in vitro*) d'un prébiotique seul ou en combinaison avec un probiotique (symbiotique). La fermentation *in vitro* en lot de la combinaison symbiotique se réalise avec 10E7 CFU/ml de probiotique et 0.1g de prébiotique (même quantité dans la condition où le prébiotique est présent seul), en présence d'un inoculat de 3% en fécès. Les résultats indiquent la moyenne (ml/g de substrat) +/- l'écart type de 3 réplicats expérimentaux. Pour les prébiotiques, GF : GOS/FOS, Inu : inuline, 2FL : 2'FL, BG : beta-glucane, amidon résistant : RS. Pour les probiotiques, BCO : *Bacillus coagulans*, BT : *Bifidobacterium thermophilum*, CB : *Clostridium butyricum*, EF : *Enterococcus faecium*, BAL : *Bifidobacterium animalis lactis*, BCU : *Bifidobacterium crudilactis*, BMO : *Bifidobacterium mongoliense*, LP : *Lactobacillus plantarum*.

La figure 4 montre l'abondance relative de groupes de bactéries bénéfiques pour l'eubiose intestinale à 24h après le démarrage de la fermentation *in vitro* en lot (fermentation statiques *in vitro*) en présence du prébiotique seul ou en présence de combinaisons symbiotiques (prébiotique + probiotique). Les groupes de bactéries bénéfiques sélectionnés comprennent les *bifidobacteria*, les *lactobacilli*, les *clostridium cluster IV*, les *clostridium cluster XIVa* et le gène butyryl-CoA:acetyl-CoA transférase. La méthode de mesure par qPCR $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ a été utilisée pour établir l'abondance relative, les mesures ont été normalisées par rapport aux bactéries totales et un mélange d'échantillons d'ADN de tous les extraits a été utilisé comme calibrateur. La fermentation *in vitro*, en fermenteur individuel, des combinaisons symbiotiques a été effectuée à 10E7 CFU/ml de probiotique et de 0.1 g de prébiotique (même quantité pour la condition avec le prébiotique seul), en présence de 3% d'un inoculat de fécès. Les résultats indiquent la moyenne (ml/g de substrat) +/- l'écart type de 3 réplicats expérimentaux.

La signifiante statistique a été analysée par un test ANOVA unidirectionnel avec une comparaison multiple de type Dunnett et où * correspond à $p < 0.05$, ** à $p < 0.01$, *** à $p < 0.01$, et **** à $p < 0.0001$. Pour les prébiotiques, GF : GOS/FOS, Inu : inuline, 2FL : 2'FL, BG : beta-glucane, amidon résistant : RS. Pour les probiotiques, BCO : *Bacillus coagulans*, BT : *Bifidobacterium thermophilum*, CB : *Clostridium butyricum*, EF : *Enterococcus faecium*, BAL : *Bifidobacterium animalis lactis*, BCU : *Bifidobacterium crudilactis*, BMO : *Bifidobacterium mongoliense*, LP : *Lactobacillus plantarum*.

La figure 5 montre la capacité du probiotique à survivre et à s'établir dans une communauté microbiale complexe. La figure 5 montre l'abondance relative de chaque probiotique par rapport aux bactéries totales à 12h, 24h et 48h après le démarrage de la fermentation pour différentes compositions symbiotiques. L'abondance relative de chaque probiotique est normalisée par rapport à la quantité relative de probiotique obtenu dans l'échantillon où juste le probiotique a été ajouté. Pour les prébiotiques, GoF : GOS/FOS, Inu : inuline, 2FL : 2'FL, BG : beta-glucane, amidon résistant : RS. Pour les probiotiques, BCO : *Bacillus coagulans*, BT : *Bifidobacterium thermophilum*, CB : *Clostridium butyricum*, EF : *Enterococcus faecium*, BAL : *Bifidobacterium animalis lactis*, LP : *Lactobacillus plantarum*.

La figure 6 montre l'évolution de la population bactérienne entre la fin de la période de stabilisation et la fin de la semaine de traitement: Les résultats sont montrés avec les compositions symbiotiques suivantes *Enterococcus faecium* (EF) + beta-glucane (BG); *Bifidobacterium thermophilum* (BT) + inuline (Inu); *Clostridium butyricum* (CB) + GOS/FOS (G/F); *Bifidobacterium animalis lactis* (BAL) + 2'FL (2FL); *Bifidobacterium crudilactis* (BC) + beta-glucane (BG); et la condition contrôle. Les résultats sont des rapport d'expression génique par rapport aux bactéries totales.

Comme indiqué précédemment, la présente invention se rapporte à une formulation symbiotique comprenant au moins un prébiotique et au moins un probiotique.

De préférence, ledit probiotique est choisi dans le groupe des
5 micro-organismes comprenant *Bifidobacterium thermophilum*,
Enterococcus faecium, *Bifidobacterium animalis lactis*, *Clostridium*
butyricum, *Bifidobacterium crudilactis*.

Dans une forme particulière de la présente invention, ledit
prébiotique est choisi dans le groupe comprenant l'inuline, le β -glucane,
10 2'Fucosyllactose, GOS/FOS, l'amidon résistant.

Il a en effet été démontré selon la présente invention que la
formulation symbiotique contenant un probiotique et un prébiotique
produit une diminution de la production d'IL-8 en test *in vitro*, et une
augmentation des «*Short Chain Fatty Acids*, *SCFAs*» ainsi qu'une
15 amélioration de la diversité et de la quantité des populations
bactériennes endogènes comme les *Lactobacillus*, les *bifidobactéries*, les
Clostridium clusters IV et *XIVa* ainsi que les bactéries intervenant dans les
voies métaboliques de production du butyrate, formant un microbiote
intestinal équilibré, conduisant de cette manière à la génération
20 ensemble d'un environnement anti-inflammatoire dans le système digestif
de l'animal, en particulier du mammifère, en particulier du porc, de
préférence de l'animal en gestation et du nouveau-né, en particulier de
la truie en gestation ou non et du porcelet.

Administrée à l'animal en gestation ou au nouveau-né, plus
25 particulièrement à la truie en gestation ou au porcelet, la formulation
symbiotique selon la présente invention favorise l'établissement d'un
microbiote intestinal équilibré de manière très précoce, protégeant
l'animal en gestation ou encore le nouveau-né, plus particulièrement la
truie en gestation ou le porcelet de manière soutenue dans le temps

contre la dysbiose par le probiotique et le prébiotique qu'elle contient, lesquels génèrent ensemble un environnement anti-inflammatoire.

De préférence, selon l'invention, ladite composition symbiotique est caractérisée en ce que ledit au moins un probiotique et
5 ledit au moins un prébiotique génèrent ensemble une augmentation des concentrations en populations bactériennes endogènes favorables au microbiote intestinal telles que les *Lactobacillus* et les *Bifidobacteria*. Avantageusement, cette augmentation des concentrations en populations bactériennes génère un meilleur équilibre du microbiote
10 intestinal de l'hôte diminuant le risque de dysbiose intestinal.

Avantageusement, selon l'invention, ladite composition symbiotique est caractérisée, de préférence, en ce que ledit au moins un probiotique et ledit au moins un prébiotique génèrent ensemble une
réduction de la concentration d'IL-8 d'au moins 10% formant ledit
15 environnement anti-inflammatoire. Dans le cadre de la présente invention, la concentration d'IL-8 a été mesurée grâce à des tests *in vitro* sur des cellules IPEC-J2 en présence du jus de fermentation (contenant ou non la composition symbiotique à tester).

Avantageusement, selon l'invention, ladite composition
20 symbiotique est caractérisée, de préférence, en ce que ledit au moins un probiotique et ledit au moins un prébiotique génèrent ensemble une stabilisation ou une augmentation de la sécrétion d'acides gras à courte chaîne (SCFA's) par le microbiote intestinal, lesdits SCFAs, produits lors du processus de fermentation du microbiote, sont un indicateur de l'équilibre
25 et de la croissance du microbiote. Les SCFAs comme le butyrate a en effet un rôle bénéfique multiple au niveau de l'intestin comme son rôle régulateur dans le transport de fluide transépithélial. Il améliore également l'état oxydatif et l'inflammation de la muqueuse de l'intestin, il renforce la barrière de défense épithéliale, il module la sensibilité

viscérale et la mobilité intestinale (Canani, R.B. et col. World J. Gastroenterol., 2011, 17: 1519-1528, doi: 10.3748/wjg.v17.i12.1519).

De préférence, selon l'invention, lesdits SCFAs sont choisis parmi le butyrate, le propionate, l'acétate, le lactate ou leurs
5 combinaisons.

Dans le cadre de la présente invention, la production desdits SCFAs est mesurée grâce au modèle de fermentation statiques *in vitro*.

De préférence, selon l'invention, la composition symbiotique est caractérisée en ce que ledit au moins un probiotique et ledit au moins
10 un prébiotique est choisi dans le groupe constitué de *Bifidobacterium thermophilum* et inuline, de *Bifidobacterium crudilactis* et beta-glucanes, de *Bifidobacterium animalis lactis* et 2'fucosyllactose, de *Clostridium butyricum* et GOS/FOS, *Enterococcus faecium* et beta-glucanes et leur mélange.

15 Avantageusement, selon l'invention, la composition symbiotique peut contenir plus de 1 probiotique, par exemple 2 probiotiques, ou par exemple 3 probiotiques, ou par exemple 4 probiotiques ou par exemple 5 probiotiques. Selon l'invention, la composition symbiotique pourra également contenir plus de 1
20 prébiotique, par exemple 2 prébiotiques, ou par exemple 3 prébiotiques, ou par exemple 4 prébiotiques. Une composition symbiotique pouvant contenir une combinaison de plusieurs probiotiques et de plusieurs prébiotiques permet d'optimiser l'environnement anti-inflammatoire et d'améliorer la production des indicateurs de croissance du microbiote tels
25 que les SCFAs.

Fermentation statique *in vitro*:

La capacité de fermentation des différentes combinaisons symbiotiques a été testée dans un modèle statique de fermentation *in*

vitro, suivant le protocole décrit par Bindelle et col. Journal of Animal Science 2010, 87, 583–93. <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0717> et par Tran et col. FEMS Microbiology Ecology 2016, 92, 1–13. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv165>. En résumé, la fermentation *in vitro*

- 5 a été réalisée dans des flacons contenant 15 ml d'une solution contenant 3% de matières fécales de porcelet en pré-sevrage; trois supports de microcosmes préalablement immergés dans de la gélose à la mucine; 100 mg de prébiotique et 1E07 CFU / ml de probiotique. Les flacons scellés ont été incubés à 39 ° C sous agitation pendant 48 h dans un bain-marie.
- 10 Trois répétitions ont été réalisées par condition de test.

Production de gaz:

- La pression du gaz a été mesurée 2, 5, 8, 12, 16, 20, 24 et 48h après le début de la fermentation pour la détermination de la cinétique de fermentation en utilisant le modèle mathématique monophasique de
- 15 Groot et col. Animal Feed Science and Technology 1996, 64, 77–89. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(96\)01012-7](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(96)01012-7). Plusieurs paramètres ont été calculés avec ce modèle: A (volume de gaz maximal, ml/g substrat), B (temps pour atteindre A/2, h), C comme constante déterminant la pente du point d'inflexion du profil, Rmax (taux de fermentation maximum,
- 20 ml/g de substrat/heure) et Tmax (temps pour atteindre Rmax).

Acides gras à chaîne courte:

- Lactate et les acides gras à chaîne courte (SCFA) ont été dosés dans le jus de fermentation obtenu après 24h par HPLC isocratique. La courbe standard utilisée contenait de l'acétate, du propionate, du
- 25 butyrate ainsi que des acides gras à chaîne ramifiée (BCFA): isobutyrate, valérate et isovalérate.

La mesure de SCFA a ensuite été calculée en tenant compte de la production basale dans les flacons témoins-mucine contenant les

supports de microcosme avec de la mucine. Les valeurs sont données en mmol par g de substrat et comparées aux mesures dans le jus de fermentation ne contenant que le prébiotique correspondant.

Détermination des modifications du microbiote par qPCR lors
5 d'un essai en modèle de fermentation statique *in vitro* en présence de
différentes compositions symbiotiques.

Pour chaque essai dans le système de fermentation statique *in vitro*, l'analyse des modifications du microbiote intestinal a été réalisée par qPCR sur des échantillons prélevés après 24 heures de fermentation.

- 10 Les séquences des amorces sens et des amorces anti-sens utilisées pour mesurer l'expression par qPCR des gènes cibles correspondant aux populations bactériennes bénéfiques pour la communauté microbienne de l'intestin sont indiquées dans le Tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1.- Séquences des amorces sens (F) et anti-sens (R) pour mesurer par qPCR des gènes cibles correspondant aux populations bactériennes bénéfiques pour la communauté microbienne de l'intestin.

Population bactérienne/gènes cibles	Gènes cibles	Séquence des amorces 5'→3' des gènes cibles	Référence
Bactéries totales	Unibac-F	CGTGCCAGCCGCGGTAATAC	Amit-Romach et col. (2004)
	Unibac-R	GGGTGCGCTCGTTGCGGGA CTTAACCCAAC	
Lactobacillus	LAA-F	CATCCAGTGCAAACCTAAGA	Wang et col. (1996)
	LAA-R	GATCCGCTTGCCTTCGC	
Bifidobacterium	Bif164-F	GGGTGGTAATGCCGGAT	Langendijk et col. (1995)
	Bif662-R	CCACCGTTACACCGGGAA	
Clostridium cluster IV	Sg-Clept-F	GCACAAGCAGTGGAG	Matsuki et col. (2004)
	Sg-Clept-R	CTTCCTCCGTTTGTCAA	
Clostridium cluster XIVa	g-Ccoc-F	AAATGACGGTACCTGACTA	Matsuki et col. (2002)
	g-Ccoc-R	CTTTGAGTTTCATTCTGCG	
Butyryl-CoA:acetate-CoA transférase	F	TGGACAGAAAGGTTGCGGA	Uerlings et col. (2019)
	R	GTGTGTACGCCCAGATCCT	

- 5 Les bactéries totales sont ciblées à l'aide des amorces décrites dans Amit-Romach E. et col. Poult Sci 2004, 83, 1093–1098, doi: [10.3382/ps/pey394](https://doi.org/10.3382/ps/pey394).

Les bactéries faisant partie du groupe lactobacillus sont ciblées à l'aide des amorces décrites dans Wang R.F. et col. Appl Environ Microbiol 1996, 62, 1242–1247, doi: [10.1128/AEM.62.4.1242-1247.1996](https://doi.org/10.1128/AEM.62.4.1242-1247.1996).

- 10 Les bactéries faisant partie du groupe bifidobacterium sont ciblées à l'aide des amorces décrites dans Langendijk P.S. et col. Appl Environ Microbiol 1995, 61, 3069–3075, doi: [10.1128/AEM.61.8.3069-3075.1995](https://doi.org/10.1128/AEM.61.8.3069-3075.1995).

- 15 Les bactéries faisant partie du groupe clostridium cluster IV sont ciblées à l'aide des amorces décrites dans Matsuki T. et col. Appl

Environ Microbiol 2004, 70, 7220–7228, doi: [10.1128/AEM.70.12.7220-7228.2004](https://doi.org/10.1128/AEM.70.12.7220-7228.2004).

Les bactéries faisant partie du groupe clostridium cluster XIVa sont ciblées à l'aide des amorces décrites dans Matsuki T. et col. Appl Environ Microbiol 2002, 68, 5445–5451, doi: [10.1128/aem.68.11.5445-5451.2002](https://doi.org/10.1128/aem.68.11.5445-5451.2002).

La Butyryl-CoA:acetate-CoA transférase est ciblée à l'aide des amorces décrites dans Uerlings J. et col. J Sci Food Agric 2019, 99, 5720–5733, doi: [10.1002/jsfa.9837](https://doi.org/10.1002/jsfa.9837).

10 **Détermination de la capacité des probiotiques de survivre et de s'établir dans un écosystème microbien complexe par qPCR lors d'un essai en modèle de fermentation statique *in vitro* en présence de différentes compositions symbiotiques.**

15 Pour chaque essai dans le modèle de fermentation statique *in vitro*, l'analyse et suivi de la présence de chaque probiotique dans le jus de fermentation a été réalisée par qPCR sur des échantillons prélevés à 12, 24 et 48 heures après le début de la fermentation. Les séquences des amorces sens et des amorces anti-sens utilisées pour mesurer par RT-qPCR l'abondance relative des probiotiques sont indiquées dans le

20 Tableau 2 ci-dessous.

Tableau 2.- Séquences des amorces sens (F) et anti-sens (R) pour mesurer par qPCR l'abondance relative des probiotiques.

Probiotique		Séquence des amorces 5'→3' des gènes cibles	Référence
<i>Bifidobacterium animalis lactis</i>	F	CCC TTT CCA CGG GTC CC	Veiga et col. (2010)
	R	AAG GGA AAC CGT GTC TCC AC	
<i>Bacillus coagulans</i>	F	GCATGGAGGAAAAAG- GAA	Hidaka et col. (2010)
	R	CCCGGCAACAGAGTTTAA	
<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	F	TTG CTT GCG GGT GAG AGT	Mathys et col. (2008)
	R	CGC CAA CAA GCT GAT AGG AC	
<i>Clostridium butyricum</i>	F	ATGGGTAGGCAAGCAGAAA	Cremonesi et col. (2012)
	R	GCTGGATCTGCCTTCTCATC	
<i>Enterococcus faecium</i>	F	GAA ACG ACG GTG TCA TCA	Loquasto et col. (2013)
	R	TCC ATT TTG TCG TTA TCT G	
<i>Lactobacillus plantarum</i>	F	TGG ATC ACC TCC TTT CTA AGG AAT	Haarman et col. (2005)
	R	TGT TCT CGG TTT CAT TAT GAA AAA ATA	
<i>Bifidobacterium crudilactis (rpoB)</i>	F	TGACCGACGAGATCACCTAT	Cette invention
	R	ACCATCTGACGTGGAGAGA	
<i>Bifidobacterium crudilactis (rplB)</i>	F	CCATCGAGCTTCGTCCTTT	Cette invention
	R	GCCTTACCGAGCTGAAGATT	

Références bibliographiques du Tableau 2:

- 5 Veiga, P., et col. 2010. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2010, 107: 18132–37, <https://doi.org/10.1073/pnas.1011737107>.
- Hidaka T., et col. *Water Research* 2010, 44, 2554–62, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.01.007>.
- 10 Mathys S. et col. *BMC Microbiology* 2008, 8, 179, <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-179>.
- Cremonesi P. et col. *Journal of Dairy Research* 2012, 79,318–23, <https://doi.org/10.1017/S002202991200026X>.

Loquasto J.R. et col. *Applied and Environmental Microbiology* 2013, 79, 6903–10, <https://doi.org/10.1128/AEM.01777-13>.

Haarman M. et col. *Applied and Environmental Microbiology* 2005, 71, 2318–24, <https://doi.org/10.1128/AEM.71.5.2318>.

5 **Détermination de la réponse immunitaire causée par incubation du jus de fermentation obtenu lors d'un essai en modèle de fermentation statique *in vitro* en présence de différentes compositions symbiotiques.**

10 Dans la cadre de la présente invention, la lignée IPEC-J2 (entérocytes intestinaux isolés du jéjunum d'un porcelet nouvellement né et non allaité (ou alimenté avec une formulation lactée) et appartenant à une lignée cellulaire ni transformée ni tumorigène) a été incubée dans le jus de fermentation produit par la combinaison symbiotique à tester ou contenant uniquement le prébiotique en question pendant 24h. A la suite
15 de cette période d'incubation, la réponse immunitaire est évaluée par la production de cytokines induites (IL-8, IL-6, IL-1b) et TNF-alpha.

 Préalablement, la cytotoxicité des jus de fermentation sur les cellules IPEC-J2 a été évaluée car pour pouvoir observer une réponse immunitaire, il est important que la lignée cellulaire reste viable. Pour
20 chaque combinaison sélectionnée, l'effet des différentes concentrations en jus de fermentation, préalablement filtré à 0.8 µm, sur la viabilité des cellules IPEC-J2 a été mesurée par le test MTT (sel de tétrazolium MTT : bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium), qui est un test colorimétrique de numérotation des cellules viables. Le contact
25 des cellules IPEC-J2 a été ensuite réalisé avec un taux d'inoculation du jus de fermentation de 0.8% (V/V).

Mesure de la concentration d'IL-8:

Dans le cadre de la présente invention, la concentration d'IL-8 a été mesurée grâce à des tests *in vitro* sur des cellules IPEC-J2 en présence du jus de fermentation (contenant ou non la composition symbiotique à tester) (voir Figure 2). Pour réaliser le test, un essai a été réalisé en comparant les concentrations de IL-8 (les autres marqueurs IL-6, IL-1b et TNF-alpha n'ont pas été détectés) produites en présence du jus de fermentation dans différentes conditions : témoin-mucine (ligne horizontale de la Figure 2), prébiotiques seules (conditions GOS/FOS (GF), 2FL, Inuline (Inu), amidon résistant (RS) et β -glucane (BG)), et symbiotiques (les autres conditions de la Figure 2). Cet essai indique que si le niveau de IL-8 est plus faible en présence du jus de fermentation contenant la composition prébiotique ou symbiotique comparé au jus de fermentation témoin-mucine, cela montre un effet anti-inflammatoire de la présence du pré- ou symbiotique. En plus, si le niveau de IL-8 est plus faible en présence du jus de fermentation contenant la composition symbiotique comparé au jus de fermentation contenant uniquement le prébiotique, cela montre que la combinaison spécifique dudit au moins un probiotique avec ledit au moins un prébiotique possède un effet anti-inflammatoire supplémentaire par rapport au prébiotique seul. La viabilité cellulaire des symbiotiques (résultats du test MTT) a été prise en compte pour ajuster les concentrations d'IL-8. Le niveau d'expression d'IL-8 est déterminé par ELISA (Porcine IL-8/CXCL8 DuoSet ELISA kit DY535: R&D Systems).

Modèle BabySPIME :

Le modèle BabySPIME est un modèle scientifiquement validé (Dufourny S. et col. Journal of Microbiological Methods, 2019, 167: 105735. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019>) qui simule la dynamique et les conditions physiologiques d'un tractus gastrointestinal complet chez le porcelet dans un environnement *in vitro* (équipement dérivé du modèle

SHIME de ProDigest Bvba, Gent, Belgium). Le modèle comprend 2 fois 3 réacteurs qui simulent de manière séquentielle l'estomac (condition acide et digestion par la pepsine), l'iléon (processus de digestion enzymatique) et le côlon proximal (processus de fermentation par le microbiote) (voir Figure 1). Ce système permet d'obtenir des communautés microbiennes complexes et stables dont la fonction et la structure sont fortement similaires aux communautés microbiennes retrouvées dans les différentes régions de l'intestin.

Des pompes péristaltiques permettent le transfert du milieu de culture, du jus pancréatique, de la bile, de l'acide (HCl 0.5M), de la base (NaOH 0.5M) et des liquides de fermentation d'un réacteur à l'autre au cours d'un cycle complet. En pratique, le réacteur 1 simule les fonctions de l'estomac, du duodenum et du jejunum, le réacteur 2 simule les fonctions de l'iléum, le réacteur 3 simule les fonctions du colon proximal.

Un essai complet dans le système babySPIME dure 3 semaines : 2 semaines de stabilisation du microbiote simule la phase de lactation suivie par une semaine de traitement avec la composition symbiotique. Une solution de 10^8 CFU/ml a été préparée pour inoculer une dose finale de 10^7 CFU/ml de contenu intestinal. La dose de prébiotique est de 2 g de prébiotique/jour pour atteindre une concentration de 1% de l'alimentation.

Les matières fécales de 6 porcelets âgé de 27 jours en allaitement et n'ayant pas subi de traitement antibiotique ont été utilisées pour préparer l'inoculat de l'étude. Les matières fécales ont été prélevées directement des porcelets et maintenues sur glace dans des conditions anaérobies. Pour chaque essai, l'inoculat a été préparé et homogénéisé pendant 10 minutes en ajoutant les matières fécales de chaque porcelet à une solution tampon de phosphate en anaérobie. Après une filtration macroscopique pour éliminer les particules encore en suspension, le filtrat

a été injecté de manière simultanée dans les réacteurs 2 et 3. Avant l'inoculation, ces deux réacteurs ont été remplis avec un milieu de culture non-acidifié et le pH a été ajusté de manière automatique dans chaque réacteur de manière à simuler au mieux les conditions physiologiques.

5 Le milieu de culture a été préparé et validé préalablement. Les bouteilles de milieu ont été stockées à 4°C et le pH a été ajusté à 3.0 avant l'utilisation dans le premier réacteur. Une solution mimant le jus pancréatique contenant du bicarbonate de sodium (2.5 g/L, VWR Chemicals, Radnol, Pennsylvania, USA), de la pancréatine (0.9g/L, 10 ProDigest) et Oxgall (4.0 g/L) a été ajouté au milieu.

Le cycle d'alimentation est planifié 3 fois par jour basé sur un temps total de rétention de 14h. Au cours de chaque cycle, le milieu de culture, maintenu à 4°C, passe dans le réacteur 1 pendant 1h30. Ensuite, le jus pancréatique/oxgall (60ml), aussi maintenu à 4°C, a été ajouté dans 15 le même réacteur pour pendant 1h. Après ce temps, et de manière simultanée, le contenu du réacteurs 1, 2 et 3 a été transvasé respectivement dans les réacteurs 2, 3 et dans un conteneur biologique de déchet.

Les conditions anaérobiques de tous les réacteurs sont 20 maintenues grâce à un flux d'azote (N₂) une fois par jour pendant 10 minutes au niveau des réacteurs. Le contenu des réacteurs est agité de manière continue (300 rpm) et maintenu à 39.5°C. Le pH des réacteurs 2 et 3 est contrôlé en continu afin de stabiliser le pH de l'iléum et du colon proximal.

25 Des prélèvements ont été collectés dans le système babySPIME durant la phase de stabilisation, avant le traitement avec les formulations symbiotiques et en fin de traitement avec le symbiotique.

Pour chaque essai dans le système babySPIME, l'analyse des modifications du microbiote intestinal a été réalisée par qPCR sur des échantillons prélevés en fin de phase de stabilisation et à la fin d'une semaine de traitement par une composition symbiotique. Les séquences des amorces sens et des amorces anti-sens utilisées pour mesurer par qPCR l'expression des gènes cibles correspondant aux populations bactériennes bénéfiques pour la communauté microbienne de l'intestin sont indiquées dans le Tableau 1 mentionné plus haut.

Trois répétitions sur le modèle SHIME ont été réalisées pour chacune des combinaisons symbiotiques.

Exemples.-

Exemple 1 : La capacité de fermentation de la composition symbiotique par modélisation de la production de gaz et la production de lactate et SCFA dans un modèle de fermentation statique *in vitro*

Les courbes de la fermentation des pré- ou symbiotiques sont montrées dans la figure 3. Dans toutes les conditions de la Figure 3, il y a une augmentation de la capacité de fermentation mesurée par l'augmentation de la production de gaz. Dans toutes les conditions de la figure 3, cette production de gaz est plus importante en présence d'une composition symbiotique par rapport à la présence du prébiotique seul.

Les paramètres issus de la modélisation de la production de gaz pendant la fermentation statique des symbiotiques sont comparés par rapport aux paramètres des prébiotiques seules (tableau 3).

Tableau 3.- Paramètres de la production de gaz de la fermentation *in vitro* en lot (fermentation statique) en présence d'un prébiotique seul ou en présence d'une combinaison entre un prébiotique et un probiotique (symbiotique). (Moy : moyenne, ET : écart-type, p-val : p-valeur).

	A - max production de gaz (ml/g de substrat)			B - Temps (heures)			C - Pente			Rmax (ml/g de substrat)			Tmax (heures)		
	Moy	ET	p-val	Moy	ET	p-val	Moy	ET	p-val	Moy	ET	p-val	Moy	ET	p-val
GOS/FOS (GoF)	323,92	3,69		5,14	0,25		2,19	0,25		42,97	0,95		3,24	0,50	
BCO-GoF	408,44	7,06	0,623	6,54	0,18	0,5054	1,76	0,06	0,271	38,70	0,36	0,6734	3,13	0,25	0,2879
BT-GoF	314,95	47,67	0,9778	5,76	0,87	0,5195	1,97	0,09	0,2918	36,17	9,43	0,2132	3,26	0,67	0,9924
CB-GoF	408,44	7,06	<0,0001	6,54	0,18	0,0047	1,76	0,06	0,168	38,70	0,36	0,6749	3,13	0,25	0,9213
EF-GoF	354,01	7,64	0,1398	5,17	0,18	0,9919	1,93	0,07	0,191	43,87	0,12	0,9763	2,85	0,22	0,5041
2FL	302,05	14,20		5,84	0,08		2,45	0,17		37,77	3,42		4,09	0,24	
BAL-2FL	341,42	9,06	0,0077	5,14	0,04	0,0004	2,09	0,10	0,0061	44,10	1,87	0,0214	3,12	0,20	0,0004
BMO-2FL	319,98	11,68	0,2079	5,29	0,22	0,002	1,77	0,03	0,0001	37,60	0,82	0,9994	2,57	0,17	<0,0001
BCU-2FL	311,19	10,43	0,6604	5,22	0,11	0,0009	1,76	0,02	<0,0001	36,97	2,06	0,9456	2,50	0,02	<0,0001
Inuline (Inu)	302,68	21,45		7,29	0,21		2,26	0,03		28,87	2,96		4,80	0,13	
BAL-Inu	358,00	7,20	0,0047	5,98	0,05	<0,0001	1,98	0,08	0,0008	38,73	1,63	0,0015	3,41	0,15	<0,0001
BT-Inu	336,31	7,27	0,0419	6,03	0,09	<0,0001	2,00	0,01	0,0012	36,23	0,38	0,0066	3,47	0,07	<0,0001
Amidon résistant (RS)	290,76	8,08		16,31	1,07		2,19	0,04		12,20	1,15		10,40	0,69	
CB-RS	393,30	18,89	<0,0001	7,07	0,25	<0,0001	1,74	0,03	0,0002	34,43	1,96	<0,0001	3,35	0,20	<0,0001
BCU-RS	297,94	5,14	0,7085	9,39	0,28	<0,0001	1,75	0,09	0,0002	19,67	0,21	0,0008	4,46	0,46	<0,0001
β -glucane (BG)	140,45	4,04		8,57	0,91		1,32	0,06		10,43	1,26		1,90	0,31	
BAL-BG	279,74	5,82	0,0004	11,53	0,26	0,149	1,14	0,01	0,3931	17,47	0,55	0,0021	1,04	0,10	0,9177
LP-BG	268,46	12,20	0,0007	12,62	0,85	0,0399	1,17	0,04	0,5212	15,03	2,26	0,0294	1,40	0,48	0,9872
EF-BG	299,97	60,05	0,0001	12,71	3,40	0,0357	1,29	0,31	0,9966	16,80	2,77	0,0041	2,89	3,67	0,8752
BCU-BG	265,88	3,82	0,0008	11,36	0,42	0,1812	1,12	0,02	0,2996	17,37	0,81	0,0023	0,86	0,15	0,8566

La cinétique de production de gaz et les paramètres du modèle incluent :

A : la production maximale de gaz ; B : le temps pour avoir 50% de la production maximale de gaz ; C : la pente ; D : le taux maximal de production de gaz (R_{max}) ; le temps à R_{max} (T_{max}). La fermentation

- 5 statique des combinaisons symbiotiques a été réalisée à $10E7$ CFU/ml de probiotique et 0.1 g de prébiotique (même quantité de prébiotique utilisée dans la condition où le prébiotique est seul) en présence de 3% d'un inoculat de fécès. Les résultats indiquent la moyenne +/- l'écart-type de 3 réplicats expérimentaux. Les p-valeurs ont été obtenues par une
- 10 analyse statistique ANOVA unidirectionnel avec un test de comparaison multiple de type Dunnett. La significativité statistique est considérée lorsque $p < 0.05$.

Les SCFAs dans le jus de fermentation après 24h de fermentation sont montrés dans le tableau 4. Il n'y avait pas de production

- 15 de lactate après 24h de fermentation.

Tableau 4.- Production des acides gras à courtes chaînes par fermentation en présence d'un prébiotique seul ou en présence des combinaisons symbiotiques analysées dans la fermentation in vitro en lot. (Moy : moyenne, ET : écart-type, p-val : p-valeur).

	ACEIATE (mmol/g de substrat)			PROPIONATE (mmol/g de substrat)			BUTYRATE (mmol/g de substrat)			BCFA (mmol/g de substrat)			SCFA TOTAUX (mmol/g de substrat)		
	Moy	ET	p-val	Moy	ET	p-val	Moy	ET	p-val	Moy	ET	p-val	Moy	ET	p-val
GOS/FOS (GoF)	2,569	0,075		2,210	0,033		0,636	0,013		0,140	0,006		5,554	0,111	
BCO-GoF	2,769	0,128	0,2845	2,426	0,083	0,8319	0,745	0,070	0,9951	0,225	0,028	0,9631	6,185	0,281	0,6103
BT-GoF	2,374	0,061	0,7595	2,671	0,084	0,4525	1,495	0,033	0,0001	0,435	0,032	0,0135	6,976	0,191	0,2029
CB-GoF	1,494	1,295	0,9491	4,860	1,040	<0,0001	2,183	0,421	<0,0001	1,104	0,281	<0,0001	9,642	3,019	0,0007
EF-GoF	2,084	0,076	0,9789	2,796	0,092	0,2856	1,432	0,072	0,0003	0,415	0,055	0,0242	6,727	0,255	0,3028
2FL	2,789	0,695		1,871	0,530		0,315	0,065		0,035	0,003		5,010	1,285	
BAL-2FL	2,682	0,090	0,9893	2,766	0,086	0,0626	1,056	0,064	<0,0001	0,370	0,041	0,0007	6,875	0,122	0,1505
8MO-2FL	1,147	0,697	0,0144	2,735	0,483	0,0722	1,264	0,132	<0,0001	0,484	0,098	0,0001	5,630	1,407	0,821
BCU-2FL	1,088	0,423	0,0119	2,811	0,354	0,0512	1,210	0,113	<0,0001	0,539	0,079	<0,0001	5,647	0,966	0,8099
Inuline (Inu)	2,956	0,087		2,387	0,058		0,698	0,029		0,123	0,008		6,163	0,084	
BAL-Inu	2,717	0,099	0,7282	2,141	0,147	0,248	1,145	0,140	0,0039	0,338	0,078	0,0046	6,341	0,392	0,9342
BT-Inu	2,979	0,727	0,9969	1,866	0,274	0,0229	1,164	0,117	0,0031	0,174	0,048	0,4423	6,183	1,161	0,9992
Amidon résistant (RS)	2,837	0,159		1,590	0,092		0,558	0,101		0,029	0,020		5,014	0,314	
CB-RS	3,763	0,267	0,0207	3,629	0,193	<0,0001	1,461	0,103	<0,0001	0,332	0,060	0,0002	9,185	0,618	0,0004
BCU-RS	2,253	0,453	0,1109	2,122	0,326	0,0479	0,521	0,060	0,837	0,039	0,033	0,9423	4,935	0,856	0,9831
β-glucane (BG)	0,609	0,075		0,820	0,032		0,056	0,009		0,000	0,000		1,485	0,099	
BAL-BG	1,389	0,322	0,0116	1,379	0,090	0,0016	0,045	0,039	0,9994	0,005	0,008	0,9806	2,818	0,300	0,0144
1P-BG	1,304	0,136	0,0225	1,527	0,076	0,0003	0,115	0,062	0,8436	0,000	0,000	>0,9999	2,946	0,253	0,0082
EF-BG	1,723	0,049	0,001	1,972	0,018	<0,0001	0,231	0,011	0,1192	0,033	0,020	0,0543	3,960	0,079	0,0002
BCU-BG	1,554	0,433	0,0033	2,042	0,274	<0,0001	0,346	0,190	0,01	0,022	0,024	0,2327	3,964	0,910	0,0002

La fermentation statique des combinaisons symbiotiques a été réalisée à 10E7 CFU/ml de probiotique et 0,1 g de prébiotique (même quantité de prébiotique utilisée dans la condition où le prébiotique est seul) en présence de 3% d'un inoculat de fécès. Les résultats indiquent la
5 moyenne +/- l'écart-type de 3 réplicats expérimentaux. Les p-valeurs ont été obtenues par une analyse statistique ANOVA unidirectionnel avec un test de comparaison multiple de type Dunnett. Lorsque $p < 0,05$: * ; $p < 0,01$: ** ; $p < 0,001$: *** ; $p < 0,0001$: ****.

Exemple 2 : Détermination des modifications du microbiote
10 par qPCR lors d'un essai en modèle de fermentation statique *in vitro* en présence de différentes compositions symbiotiques

L'abondance relative des bactéries bénéfiques après 24h de fermentation sont présentés dans la figure 4. La méthode de delta-delta CT a été utilisée pour exprimer les bactéries cibles par rapport aux
15 bactéries totales. Les résultats des symbiotiques sont comparés par rapport aux prébiotiques seuls. Comme l'indique la figure 4, plusieurs compositions symbiotiques, comme BT-GF, CB-GF, BCO-GF, BCU-2FL, BMO-2FL, BAL-2FL, BAL-Inu, BT-Inu, CB-RS, BCU-RS, BAL-BG, LP-BG, ou BCU-BG, permettent d'augmenter de manière significative l'abondance
20 relative des bactéries bénéfiques à 24h de fermentation.

Exemple 3 : Détermination de la capacité des probiotiques de survivre et de s'établir pendant la fermentation

La figure 5 montre la présence des probiotiques dans le jus de fermentation après 12, 24 et 48h de fermentation. Des compositions
25 symbiotiques, comme BT-Inu, permettent une bon établissement et une bonne capacité de survie du probiotique.

Exemple 4 : Détermination de l'effet immunomodulateur de la composition symbiotique par quantification de la production d'IL-8 et NO par des cellules IPEC-J2.

La production d'IL-8 dans les cellules IPEC-J2 a été mesurée
5 par un test ELISA.

Après 24h d'incubation, la réponse immunitaire a été évaluée en mesurant la production d'IL-8 dans le milieu de culture cellulaire. Les cellules IPEC-J2 ont été incubées avec 0,8 % (V/V) de jus de fermentation préalablement stérilisé par filtration. De plus, le taux de survie des cellules
10 IPEC-J2 est supérieur ou égal à 70% dans toutes les conditions testées de jus de fermentation.

Pour déterminer l'impact de la composition symbiotique contenue dans le jus de fermentation sur la production d'IL-8, le taux de production d'IL-8 a été mesuré dans une condition contrôle où le jus de fermentation contient un inoculat de fèces, de la mucine (témoin-mucine), mais en absence de probiotiques, de prébiotiques ou de symbiotiques. Dans cette condition contrôle, un niveau de base d'expression d'IL-8 est de 932 pg/ml (représenté par la ligne horizontale à
15 la figure 2). Les pré- et symbiotiques ont été comparé par rapport au témoin-mucine. En plus les symbiotiques ont été comparé par rapport au prébiotique pour estimer l'effet additionnel de probiotique. Le tableau 5
20 montre les p-valeurs de ces comparaisons, et la figure 2 montre les concentrations d'IL8.

Tableau 5.- Production d'IL-8 par les cellules IPEC-J2 dans le surnageant après 24h d'incubation avec 0,8% de jus de fermentation préalablement stérilisé par filtration produit par la composition symbiotique ou le prébiotique seul.

	IL-8 (pg/ml)			
	moyenne	ET	p-valeur	
			(vs prébiotique)	(vs blanc-mucine)
GOS/FOS (GF)	1094,0	40,5		0,0421
BCO-GF	897,3	96,3	0,0041	0,9207
BT-GF	1089,4	89,8	0,9999	0,0497
CB-GF	849,5	59,4	0,0006	0,3954
EF-GF	927,5	40,6	0,0138	0,9997
2'FL	1041,2	52,6		0,2193
BAL-2FL	581,3	81,1	<0,0001	<0,0001
BCU-2FL	570,8	81,8	<0,0001	<0,0001
BMO-2FL	715,1	41,5	<0,0001	0,0037
INULINE (Inu)	1116,4	40,9		0,0258
BAL-Inu	1177,7	112,6	0,4075	0,004
BT-Inu	1025,9	31,4	0,1816	0,3398
Amidon résistant (RS)	753,3	50,9		0,0086
BCU-RS	1150,3	38,9	<0,0001	0,003
CB-RS	1195,6	61,3	<0,0001	0,0007
β-GLUCANE	831,7	40,5		0,1916
BAL-BG	393,6	30,0	<0,0001	<0,0001
BCU-BG	413,2	46,4	<0,0001	<0,0001
EF-BG	1128,9	60,0	<0,0001	0,0066
LP-BG	775,7	106,0	0,5405	0,0232
blanc-mucine	937,1	110,8		

5

Les valeurs sont corrigées en fonction de la viabilité cellulaire. Les résultats sont des moyennes avec leurs écart-types. Les comparaisons sont réalisées entre les compositions symbiotiques et le prébiotique seul. Les significativités statistiques sont analysées par une ANOVA unidirectionnel avec un test de comparaison multiple de type Dunnett. Lorsque $p < 0,05$: * ; $p < 0,01$: ** ; $p < 0,001$: *** ; $p < 0,0001$: ****.

10

Exemple 5 : Détermination des modifications du microbiote par qPCR lors d'un essai en modèle baby SPIME en présence de différentes compositions symbiotiques.

Les résultats globaux obtenus sur le système baby SPIME sont présentés dans la figure 6 et le tableau 6.

Tableau 6.- Synthèse de la régulation à la hausse ou à la baisse de groupes bactériens d'intérêt suite au traitement symbiotique dans le système SHIME après une semaine de traitement avec les différents symbiotiques.

Test Wilcoxon	<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Cluster IV	Cluster XIV	Acetyl CoA
Control SHIME	Baisse $p < 0,01$	Tendance à la baisse $0,05 < p < 0,1$	Stable	Stable	Stable
EF + BG	Stable	Tendance à la baisse $0,05 < p < 0,1$	Baisse $p = 0,01$	Stable	Hausse $p < 0,05$
BT + INU	Stable	Tendance à la hausse $0,05 < p < 0,1$	Hausse $p < 0,05$	Baisse ($p = 0,05$)	Stable
CB + GOS/FOS	Baisse $p < 0,01$	Stable	Stable	Stable	Hausse $p < 0,01$
BAL + 2FL	Baisse $p < 0,01$	Hausse $p < 0,05$	Stable	Stable	Stable
BCU + BG	Baisse $p < 0,01$	Tendance à la hausse $0,05 < p < 0,1$	Hausse $p < 0,05$	Tendance à la baisse $0,05 < p < 0,1$	Stable

10

Nous retrouvons soit une diminution de la population bactérienne, soit une augmentation de la population bactérienne ou soit une stabilisation de la population bactérienne. Le test statistique réalisé est un test de Wilcoxon.

Exemple 6 : Composition symbiotique C1 comprenant au moins *Clostridium butyricum* et au moins GOS/FOS contre la dysbiose intestinale.

On a préparé la composition C1 en ajoutant 1E07 CFU/ml
5 *Clostridium butyricum* et 0,1 g de GOS/FOS.

Plus particulièrement, au niveau du prébiotique, 0,1g de GOS/FOS a été ajouté dans chaque flacon de fermentation contenant 15ml de jus de fermentation. Pour le mélange GOS/FOS, le prébiotique consiste en une solution liquide homogène de 80% (p/p) de GOS et 20%
10 (p/p) de FOS. Au niveau du probiotique, une poudre lyophilisée de bactérie a été pré-mixé dans une solution tampon à une concentration de 1,5E08 CFU/ml (solution stock). Avant d'être ajouté au flacon de fermentation, la solution pré-mixée de probiotique a subi un processus de revivification consistant en une incubation de 30 min, à 37°C sous
15 agitation. Ensuite, 1 ml de la solution pré-mixée (solution stock) a été ajouté au flacon menant à une concentration finale en probiotique de 1E07 CFU/ml dans le flacon.

La composition symbiotique comprenant au moins *Clostridium butyricum* et au moins GOS/FOS contre la dysbiose intestinale
20 a montré un effet favorable sur la fermentation, en augmentant la valeur A (production maximale de gaz) par rapport au prébiotique seul (voir condition CB-GoF du Tableau 3, et en augmentant les concentrations de SCFAs totales et butyrate après 24 heures de fermentation statique *in vitro* (voir condition CB-GoF du Tableau 4). En plus, l'abondance relative des
25 Bifidobacteria et Lactobacilli a augmenté en comparaison avec le prébiotique seul (voir condition CB-GF de la Figure 4). Le probiotique *Clostridium butyricum* était encore présent dans le jus de fermentation après 48h de fermentation. Un effet anti-inflammatoire est montré *in vitro* sur des cellules IPEC-J2 générant une diminution de la production d'IL-8

par rapport au GOS/FOS seul, tandis que la concentration d'IL-8 n'était pas différent par rapport au témoin-mucine (voir condition CB-GF de la Figure 2).

De plus, la composition symbiotique C1 montre une
5 amélioration du microbiote dans le modèle SHIME en augmentant les populations bactériennes impliquées dans les voies métaboliques de production de butyrate. L'augmentation de ces populations bactériennes a été analysée par qPCR (voir condition CB + G/F de la Figure 6 et Tableau 6 présentés plus haut). Les séquences des amorces
10 sens et des amorces anti-sens utilisées pour mesurer par qPCR l'abondance relative des populations bactériennes bénéfiques pour la communauté microbienne de l'intestin sont indiquées dans le Tableau 1.

Exemple 7 : Composition symbiotique C2 comprenant au moins *Bifidobacterium thermophilum* et au moins l'inuline contre la
15 dysbiose intestinale.

On a préparé la composition C2 en ajoutant 1E07 CFU/ml de *Bifidobacterium thermophilum* et 0,1 g d'inuline.

Plus particulièrement, au niveau du prébiotique, 0,1 g d'inuline a été ajouté dans chaque flacon de fermentation contenant 15ml de jus
20 de fermentation. Au niveau du probiotique *Bifidobacterium thermophilum*, une poudre lyophilisée de bactérie a été pré-mixé dans une solution tampon à une concentration de 1,5E08 CFU/ml (solution stock). Avant d'être ajouté au flacon de fermentation, la solution pré-mixée de probiotique a subi un processus de revivification consistant en
25 une incubation de 30 min, à 37°C sous agitation. Ensuite, 1 ml de la solution pré-mixée (solution stock) a été ajouté au flacon menant à une concentration finale en probiotique de 1E07 CFU/ml dans le flacon.

La composition symbiotique C2 comprenant *Bifidobacterium thermophilum* (BT) et de l'inuline (Inu) contre la dysbiose intestinale a montré un effet bénéfique sur la fermentation, démontré par une augmentation de la valeur A (production maximale de gaz), une diminution de la valeur B (le temps pour atteindre 50% de la production maximale de gaz), une augmentation de la vitesse de fermentation (Rmax), et une diminution du temps pour atteindre la quantité maximale de gaz produite (Tmax) par rapport à l'inuline seule (voir condition BT-Inu du Tableau 3). En plus, une augmentation de la concentration de butyrate et l'abondance relative des bifidobactéries dans le jus de fermentation après 24h est démontré (voir condition BT-Inu de la Figure 4), *Bifidobacterium thermophilum* était bien présent jusqu'à la fin de la fermentation. Un effet anti-inflammatoire *in vitro* sur des cellules IPEC-J2 générant une diminution de la production d'IL-8 par rapport à l'inuline seule (pas de différence entre le symbiotique et le témoin-mucine) selon le protocole décrit à l'exemple 1 (voir condition BT-Inu de la Figure 2).

De plus, la composition symbiotique C2 montre une amélioration du microbiote dans le modèle SHIME en augmentant les populations bactériennes impliquées dans les voies métaboliques de production de butyrate et montrant une tendance à l'augmentation des bifidobactéries. L'augmentation de ces populations bactériennes a été mesurée par qPCR (voir condition BT + INU de la Figure 6 et Tableau 6). Les séquences des amorces sens et des amorces anti-sens utilisées pour mesurer par qPCR l'abondance relative des populations bactériennes bénéfiques pour la communauté microbienne de l'intestin sont indiquées dans le Tableau 1.

Exemple 8 : Composition symbiotique C3 comprenant au moins *Bifidobacterium animalis lactis* et au moins 2'FL contre la dysbiose intestinale.

On a préparé la composition C3 en ajoutant 1E07 CFU/ml de *Bifidobacterium animalis lactis* et 0,1 g de 2'FL.

Plus particulièrement, au niveau du prébiotique, 0,1g de 2'FL a été ajouté dans chaque flacon de fermentation contenant 15ml de jus de fermentation. Au niveau du probiotique *Bifidobacterium animalis lactis*, une poudre lyophilisée de bactérie a été pré-mixé dans une solution tampon à une concentration de 1,5E08 CFU/ml (solution stock). Avant d'être ajouté au flacon de fermentation, la solution pré-mixée de probiotique a subi un processus de revivification consistant en une incubation de 30 min, à 37°C sous agitation. Ensuite, 1 ml de la solution pré-mixée (solution stock) a été ajouté au flacon menant à une concentration finale en probiotique de 1E07 CFU/ml dans le flacon.

La composition symbiotique C3 contre la dysbiose intestinale a montré un effet bénéfique sur la fermentation, démontré par une augmentation de la valeur A (production maximale de gaz), une diminution de la valeur B (le temps pour atteindre 50% de la production maximale de gaz), une augmentation de la vitesse de fermentation (Rmax), et une diminution du temps pour atteindre la quantité maximale de gaz produite (Tmax) par rapport à 2'FL seule (voir condition Bal-2FL du Tableau 3). En plus, une augmentation de la concentration de butyrate (voir condition BAL-2FL du Tableau 4) et l'abondance relative des *Clostridium* clusters IV dans le jus de fermentation après 24h est démontré (voir condition BAL-2FL de la Figure 4), *Bifidobacterium animalis lactis* était bien présent jusqu'à la fin de la fermentation. Un effet anti-inflammatoire *in vitro* sur des cellules IPEC-J2 générant une diminution de la production d'IL-8 (voir condition BAL-2FL de la Figure 2) par rapport à 2'FL seul et par rapport au témoin-mucine selon le protocole de l'exemple 1.

De plus, la composition symbiotique C3 montre une amélioration du microbiote dans le modèle SHIME en augmentant les

populations bactériennes de bifidobactéries. L'augmentation de ces populations bactériennes a été mesurée par qPCR (voir condition BAL + 2FL de la Figure 6 et Tableau 6). Les séquences des amorces sens et des amorces anti-sens utilisées pour mesurer par qPCR l'abondance relative des populations bactériennes bénéfiques pour la communauté microbienne de l'intestin sont indiquées dans le Tableau 1.

Exemple 9 : Composition symbiotique C4 comprenant *Bifidobacterium crudilactis* et du beta-glucane contre la dysbiose intestinale.

On a préparé la composition C4 en ajoutant 1E07 CFU/ml de *Bifidobacterium crudilactis* et 0,1 g de beta-glucane.

Plus particulièrement, au niveau du prébiotique, 0,1g de beta-glucane a été ajouté dans chaque flacon de fermentation contenant 15ml de jus de fermentation. Au niveau du probiotique *Bifidobacterium animalis lactis*, une poudre lyophilisée de bactérie a été pré-mixé dans une solution tampon à une concentration de 1,5E08 CFU/ml (solution stock). Avant d'être ajouté au flacon de fermentation, la solution pré-mixée de probiotique a subi un processus de revivification consistant en une incubation de 30 min, à 37°C sous agitation. Ensuite, 1 ml de la solution pré-mixée (solution stock) a été ajouté au flacon menant à une concentration finale en probiotique de 1E07 CFU/ml dans le flacon.

La composition symbiotique C4 comprenant *Bifidobacterium crudilactis* et du beta-glucane contre la dysbiose intestinale a montré un effet bénéfique sur la fermentation, démontré par une augmentation de la valeur A (production maximale de gaz) et une augmentation de la vitesse de fermentation (R_{max}) par rapport au beta-glucane seul (voir condition BCU-BG du Tableau 3). En plus, après 24h de fermentation, une augmentation de la concentration des SCFAs totales et de butyrate (voir condition BCU-BG du Tableau 4) et l'abondance relative des *Clostridium*

clusters XIVa dans le jus de fermentation est démontré (voir condition BCU-BG de la Figure 4). Un effet anti-inflammatoire est démontré *in vitro* sur des cellules IPEC-J2 générant une diminution de la production d'IL-8 par rapport au beta-glucane seule et par rapport au témoin-mucine selon le protocole décrit à l'exemple 1 (voir condition BCU-BG de la Figure 2).

De plus, la composition symbiotique C4 montre une amélioration du microbiote dans le modèle SHIME en augmentant les populations bactériennes impliquées dans les voies métaboliques de production de butyrate et montrant une tendance à l'augmentation des bifidobactéries. L'augmentation de ces populations bactériennes a été mesurée par qPCR (voir condition BC + BG de la Figure 6 et Tableau 6). Les séquences des amorces sens et des amorces anti-sens utilisées pour mesurer par qPCR l'abondance relative des populations bactériennes bénéfiques pour la communauté microbienne de l'intestin sont indiquées dans le Tableau 1.

Exemple 10 : Composition symbiotique C5 comprenant *Enterococcus faecium* et du beta-glucane contre la dysbiose intestinale.

La composition symbiotique C5 contre la dysbiose intestinale a montré un effet bénéfique sur la fermentation, démontré par une augmentation de la valeur A (production maximale de gaz) et une augmentation de la vitesse de fermentation (R_{max}) par rapport au beta-glucane seul (voir condition EF-BG du Tableau 3). En plus, après 24h de fermentation, une augmentation de la concentration des SCFAs totales et de butyrate dans le jus de fermentation est démontré (voir condition EF-BG du Tableau 4).

De plus, la composition symbiotique C5 montre une amélioration du microbiote dans le modèle SHIME en augmentant les populations bactériennes impliquées dans les voies métaboliques de production de butyrate mais pas des bifidobactéries. L'augmentation de

ces populations bactériennes a été mesurée par qPCR (voir condition EF + BG de la Figure 6 et Tableau 6). Les séquences des amorces sens et des amorces anti-sens utilisées pour mesurer par qPCR l'abondance relative des populations bactériennes bénéfiques pour la communauté microbienne de l'intestin sont indiquées dans le Tableau 1.

Exemple 11 : Composition symbiotique SYN 3 comprenant *E. faecium*, *C. butyricum*, du beta-glucane et de l'inuline contre la dysbiose intestinale et doses administrées *in vivo* à la truie avant mise bas et après mise bas.

Pour les probiotiques, la quantité administrée est indiquée en CFU/truie/jour, tandis que pour les prébiotiques, la quantité administrée est indiquée en g/truie/jour (voir Tableau 7).

L'administration *in vivo* de la composition symbiotique a été réalisée à 4 stades de développement différents : avant mise bas, une semaine après mise bas, 2 semaines après mise bas et 3 semaines après mise bas.

Tableau 7.- Composition symbiotique SYN3 comprenant *E. faecium*, *C. butyricum*, du beta-glucane et de l'inuline et quantité de chaque probiotique et prébiotique administrée par jour à 4 stades de développement.

SYN3	Probiotique		Prébiotique	
	<i>E. faecium</i> (CFU/truie/jour)	<i>C. butyricum</i> (CFU/truie/jour)	Beta-glucane (g/truie/jour)	Inuline (g/truie/jour)
G80-G107 (avant mise bas, MB)	1,60E+09	1,60E+09	1,60	9,60
MB+1sem.	1,20E+09	1,20E+09	1,20	7,20
MB+2sem.	2,75E+09	2,75E+09	2,75	16,50
MB+3sem.	2,50E+09	2,50E+09	2,50	15,00

MB : mise-bas ; G : jour de gestation

Les 4 stades de développement sont G80-G107 (entre 80 jours et 107 jours de gestation, avant mise bas), 1 semaine après mise bas, 2 semaines après mise base et 3 semaines après mise bas.

- 5 **Exemple 12 :** Composition symbiotique SYN 4 comprenant *E. faecium*, *B. animalis lactis*, *B. crudilactis*, du beta-glucane et de l'inuline contre la dysbiose intestinale et doses administrées *in vivo* à la truie avant mise bas et après mise bas.

- 10 Pour les probiotiques, la quantité administrée est indiquée en CFU/truie/jour, tandis que pour les prébiotiques, la quantité administrée est indiquée en g/truie/jour (voir Tableau 8).

- 15 L'administration *in vivo* de la composition symbiotique a été réalisée à 4 stades de développement différents : G80-G107 (entre 80 et 107 jours de gestation, avant mise bas, MB), une semaine après mise bas, 2 semaines après mise bas et 3 semaines après mise bas.

Tableau 8.- Composition symbiotique SYN4 comprenant *E. faecium*, *B. animalis lactis*, *B. crudilactis*, du beta-glucane et de l'inuline et quantité de chaque probiotique et prébiotique administrée par jour à 4 stades de développement.

SYN4	Probiotique			Prébiotique	
	<i>E. faecium</i> (CFU/truie/jour)	<i>B. animalis lactis</i> (CFU/truie/jour)	<i>B. crudilactis</i> (CFU/truie/jour)	Beta glucane (g/truie/jour)	Inuline (g/truie/jour)
G80-G107 (avant mise bas, MB)	1,07E+09	1,07E+09	1,07E+09	1,60	9,60
MB+1sem,	8,00E+08	8,00E+08	8,00E+08	1,20	7,20
MB+2sem,	1,83E+09	1,83E+09	1,83E+09	2,75	16,50
MB+3sem,	1,67E+09	1,67E+09	1,67E+09	2,50	15,00

5 MB : mise-bas ; G : jour de gestation

Exemple 13 : Composition symbiotique contre la dysbiose intestinale et doses administrées *in vivo* au porcelet

Dans un essai *in vivo* (première expérience), le symbiotique 1 est composé de *Clostridium butyricum* et GOS/FOS et le symbiotique 2 est composé de *B. animalis lactis* et 2'FL (voir Tableaux 9 et 10 ci-dessous). Les quantités distribuées aux porcelets, avec un pistolet d'administration sont indiquées dans le tableau 9. De manière contrôlée, les porcelets ont ingéré une quantité déterminée de symbiotique, qui a augmenté avec l'âge.

15 Dans un autre essai *in vivo* (deuxième expérience), les mêmes symbiotiques ont été testés. Cette fois, le symbiotique est distribué aux porcelets par le pistolet d'administration à la naissance et au jour 4-5, et ensuite dans le lait de remplacement et l'aliment 'creep feed'

(alimentation sous la truie) distribué uniquement aux porcelets (pas aux truies). Les quantités des symbiotiques distribués aux porcelets sont indiquées dans le tableau 10.

- 5 Il est bien entendu que la présente invention n'est en aucune façon limitée aux formes de réalisations décrites ci-dessus et que bien des modifications peuvent y être apportées sans sortir du cadre des revendications annexées.

Tableau 9.- Composition symbiotique contre la dysbiose intestinale et doses administrées *in vivo* au porcelet dans une première expérience.

Expérience: CRA -w			Dosage (par pistolet)				
			Jour 2 après naissance	Jour 3-4	Jour 5-8	Jour 9-15	Jour 16-28
Symbiotique 1							
Probiotique 1: Clostridium butyricum	1,00E+09 CFU/g	60 g/100 ml	1,25 ml/porcelet	1,75 ml/porcelet	2,5 ml/porcelet/jour	3,75 ml/porcelet/jour	5 ml/porcelet /jour
			0,75 g/porcelet/jour	1,05 g/porcelet/jour	1,5 g/porcelet/jour	2,25 g/porcelet/jour	3 g/porcelet/jour
GOS (80%)	0,32 g/ml		7,50E+08 CFU/porcelet/jour	1,05E+09 CFU/porcelet/jour	1,50E+09 CFU/porcelet/jour	2,25E+09 CFU/porcelet/jour	3,00E+09 CFU/porcelet/jour
			0,4 g/porcelet/jour	0,56 g/porcelet/jour	0,8 g/porcelet/jour	1,2 g/porcelet/jour	1,6 g/porcelet/jour
			0,1 g/porcelet/jour	0,14 g/porcelet/jour	0,2 g/porcelet/jour	0,3 g/porcelet/jour	0,4 g/porcelet/jour
FOS (20%)	0,08 g/ml		0,5 g/porcelet/jour	0,7 g/porcelet/jour	1 g/porcelet/jour	1,5 g/porcelet/jour	2 g/porcelet/jour
			Symbiotique 2				
Probiotique 2: B. animalis lactis	1,00E+10 CFU/g	6 g/100 ml	7,50E-02 g/porcelet/jour	1,05E-01 g/porcelet/jour	0,15 g/porcelet/jour	0,225 g/porcelet/jour	0,3 g/porcelet/jour
			7,50E+08 CFU/porcelet/jour	1,05E+09 CFU/porcelet/jour	1,50E+09 CFU/porcelet/jour	2,25E+09 CFU/porcelet/jour	3,00E+09 CFU/porcelet/jour
2'FL	0,4 g/ml		0,5 g/porcelet/jour	0,7 g/porcelet/jour	1 g/porcelet/jour	1,5 g/porcelet/jour	1,6 g/porcelet/jour

Tableau 10,- Composition symbiotique contre la dysbiose intestinale et doses administrées *in vivo* au porcelet dans une deuxième expérience.

Expérience: ferme Aveve			Dosage		lait de remplacement	Alimentation sous la mère
			Dosage (par pistolet)			
			naissance	4-5 jours		
Symbiotique 1			1,5 ml/porcelet	2 ml/porcelet	2 ml/porcelet/jour	4 ml/porcelet/jour
PROBIOTIQUE 1: <i>Clostridium butyricum</i>	1,00E+09 CFU/g	60 g/100ml	0,9 g/porcelet/jour	1,2 g/porcelet/jour	1,2 g/porcelet/jour	2,4 g/porcelet/jour
			9,00E+08 CFU/porcelet/jour	1,20E+09 CFU/porcelet/jour	1,20E+09 CFU/porcelet/jour	2,40E+09 CFU/porcelet/jour
	GOS (80%)		0,48 g/porcelet/jour	0,64 g/porcelet/jour	0,64 g/porcelet/jour	1,28 g/porcelet/jour
	FOS (20%)		0,12 g/porcelet/jour	0,16 g/porcelet/jour	0,16 g/porcelet/jour	0,32 g/porcelet/jour
Total prébiotique	0,4 g/ml		0,6 g/porcelet/jour	0,8 g/porcelet/jour	0,8 g/porcelet/jour	1,6 g/porcelet/jour
Symbiotique 2						
PROBIOTIQUE 2: <i>B. animalis lactis</i>	1,00E+10 CFU/g	6 g/100ml	0,09 g/porcelet/jour	0,12 g/porcelet/jour	0,12 g/porcelet/jour	0,24 g/porcelet/jour
			9,00E+08 CFU/porcelet/jour	1,20E+09 CFU/porcelet/jour	1,20E+09 CFU/porcelet/jour	2,40E+09 CFU/porcelet/jour
2FL	0,4 g/ml		0,6 g/porcelet/jour	0,8 g/porcelet/jour	0,8 g/porcelet/jour	1,6 g/porcelet/jour

« Revendications »

1. Composition symbiotique administrable à l'animal, en particulier au mammifère, en particulier au porc, en particulier de l'animal en gestation et au nouveau-né, en particulier à la truie en gestation ou non et au porcelet comprenant au moins un probiotique et au moins un prébiotique pour le traitement ou la prévention de la dysbiose, caractérisée en ce que ledit au moins un probiotique et ledit au moins un prébiotique sont choisis de telle manière qu'ils génèrent ensemble un environnement anti-inflammatoire dans l'intestin dudit animal, en particulier du mammifère, en particulier du porc, de préférence de l'animal en gestation et au nouveau-né, en particulier à la truie en gestation ou non et au porcelet.

2. Composition selon la revendication 1, dans lequel ledit probiotique est choisi dans le groupe des micro-organismes comprenant *Bifidobacterium thermophilum*, *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium animalis lactis*, *Clostridium butyricum*, *Bifidobacterium crudilactis*.

3. Composition selon la revendication 1 ou 2, dans laquelle ledit prébiotique est choisi dans le groupe comprenant l'inuline, le β -glucane, 2'Fucosyllactose, GOS/FOS (galactoligosaccharide, fructoligosaccharide), l'amidon résistant.

4. Composition selon l'une des revendications précédentes 1 à 3, caractérisée en ce que ledit au moins un probiotique et ledit au moins un prébiotique génèrent ensemble une augmentation des concentrations en populations bactériennes endogènes favorables au microbiote intestinal telles que les *Lactobacillus*, et les *Bifidobacteria*.

5. Composition selon l'une des revendications précédentes 1 à 4, caractérisée en ce que ledit au moins un probiotique et ledit au moins un prébiotique génèrent ensemble une réduction de la

concentration d'IL-8 d'au moins 10 %, formant ledit environnement anti-inflammatoire.

6. Composition selon l'une des revendications précédentes 1 à 5, caractérisée en ce que ledit au moins un probiotique et ledit au moins un prébiotique génèrent ensemble une stabilisation ou une augmentation de la sécrétion d'acides gras à courte chaîne (SCFA's) par le microbiote intestinal, lesdits SCFAs, produits lors du processus de fermentation du microbiote, sont un indicateur de l'équilibre et de la croissance du microbiote.

7. Composition selon la revendication 6, dans laquelle lesdits SCFAs sont choisis parmi le butyrate, le propionate, l'acétate, le lactate ou leurs combinaisons.

8. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle ledit au moins un probiotique et ledit au moins un prébiotique est choisi dans le groupe constitué de *Bifidobacterium thermophilum* et inuline, de *Bifidobacterium crudilactis* et beta-glucanes, de *Bifidobacterium animalis lactis* et 2'fucosyllactose, de *Clostridium butyricum* et GOS/FOS, *Enterococcus faecium* et beta-glucanes et leur mélange.

9. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, contenant plus de 1 probiotique, par exemple 2 probiotiques, ou par exemple 3 probiotiques, ou par exemple 4 probiotiques ou par exemple 5 probiotiques.

10. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, contenant plus de 1 prébiotique, par exemple 2 prébiotiques, ou par exemple 3 prébiotiques, ou par exemple 4 prébiotiques.

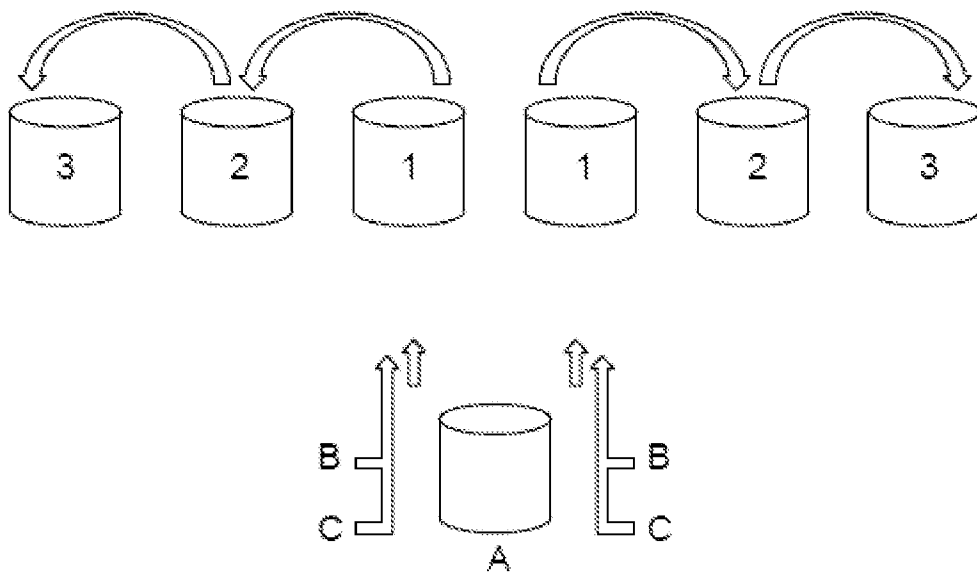
11. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, contenant au moins un excipient conventionnel, sous forme liquide ou solide.

12. Complément alimentaire pour le traitement préventif et/ou curatif de la dysbiose, comprenant ladite composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 11.

5 13. Aliment complet ou complémentaire pour animaux d'élevage comprenant ladite composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, ledit aliment étant sous forme de farine et/ou de granulés et/ou d'alimentations lactées et/ou toutes autres formes de conditionnement alimentaire.

10 14. Aliment pour nouveau-né animal comprenant ladite composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 11 et une base lactée compatible avec l'alimentation du nouveau-né.

15 15. Utilisation d'une composition selon l'une des revendications 1 à 11, pour le traitement préventif et/ou curatif de la dysbiose, comprenant au moins une administration de ladite composition selon l'une des revendications 1 à 11 à raison d'une quantité de prébiotique comprise entre 0,1 et 1000 g/jour/animal, préférentiellement entre 0,5 et 100 g/jour/animal, de manière avantageuse entre 1 et 25 g/jour/animal, d'une quantité de probiotique comprise entre 1,00E+05 et 1,00E+015 CFU/jour/animal, préférentiellement entre 1,00E+06 et 20 1,00E+013 CFU/jour/animal, de manière avantageuse entre 1,00E+07 et 1,00E+011 CFU/jour/animal et au moins une administration d'une ration alimentaire quotidienne, ledit probiotique et ledit prébiotique de la composition selon l'une des revendications 1 à 11 étant administrée de manière simultanée, séparée ou échelonnée dans le temps.

**Figure 1**

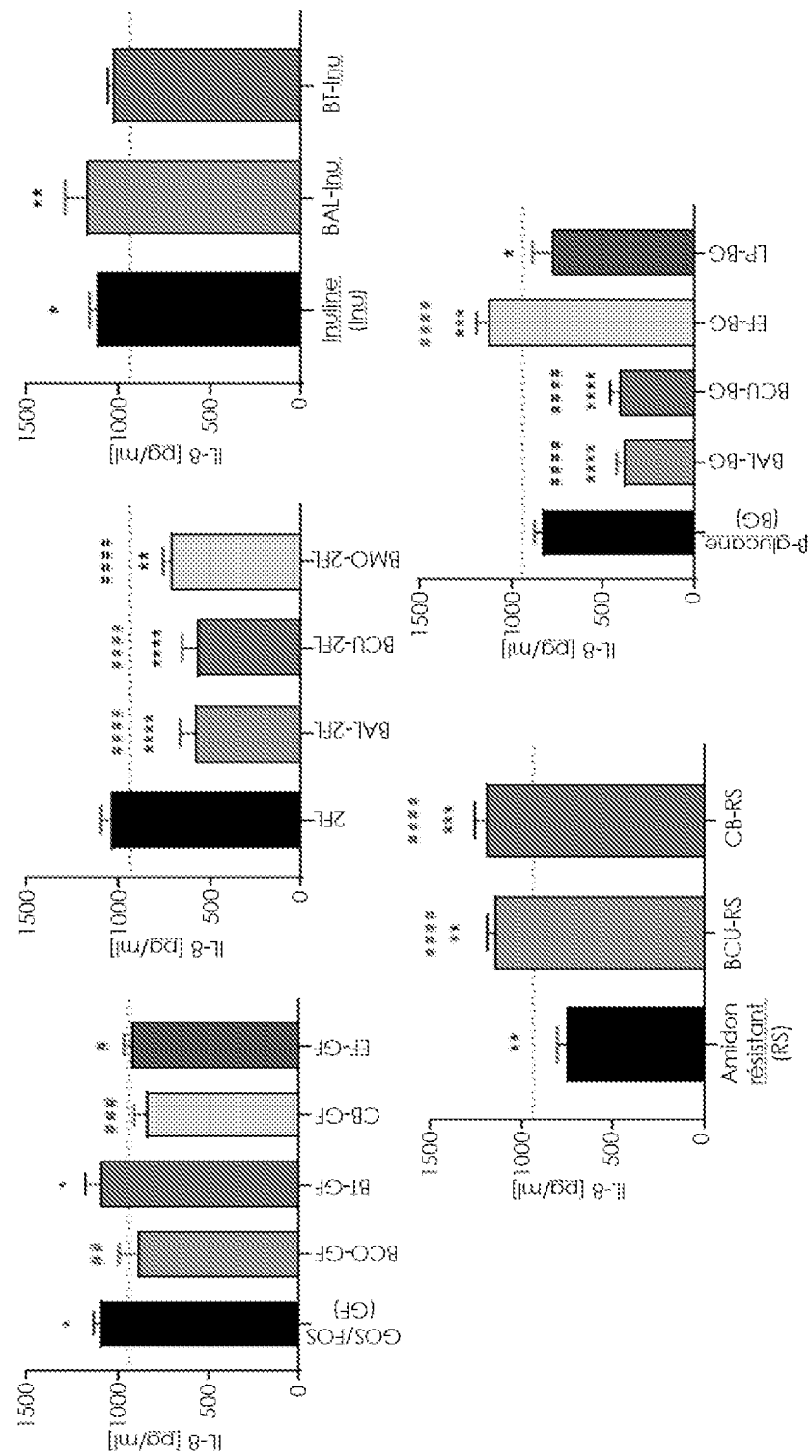


Figure 2

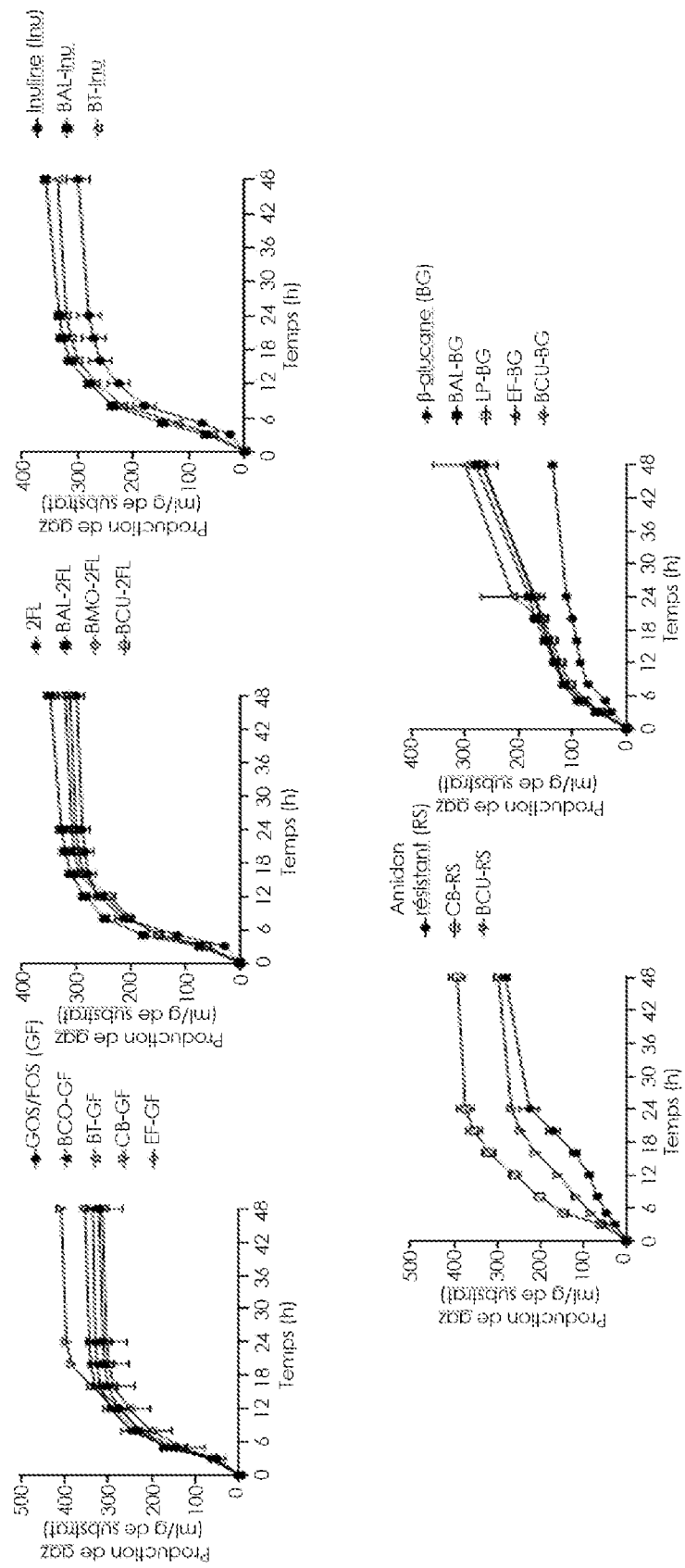


Figure 3

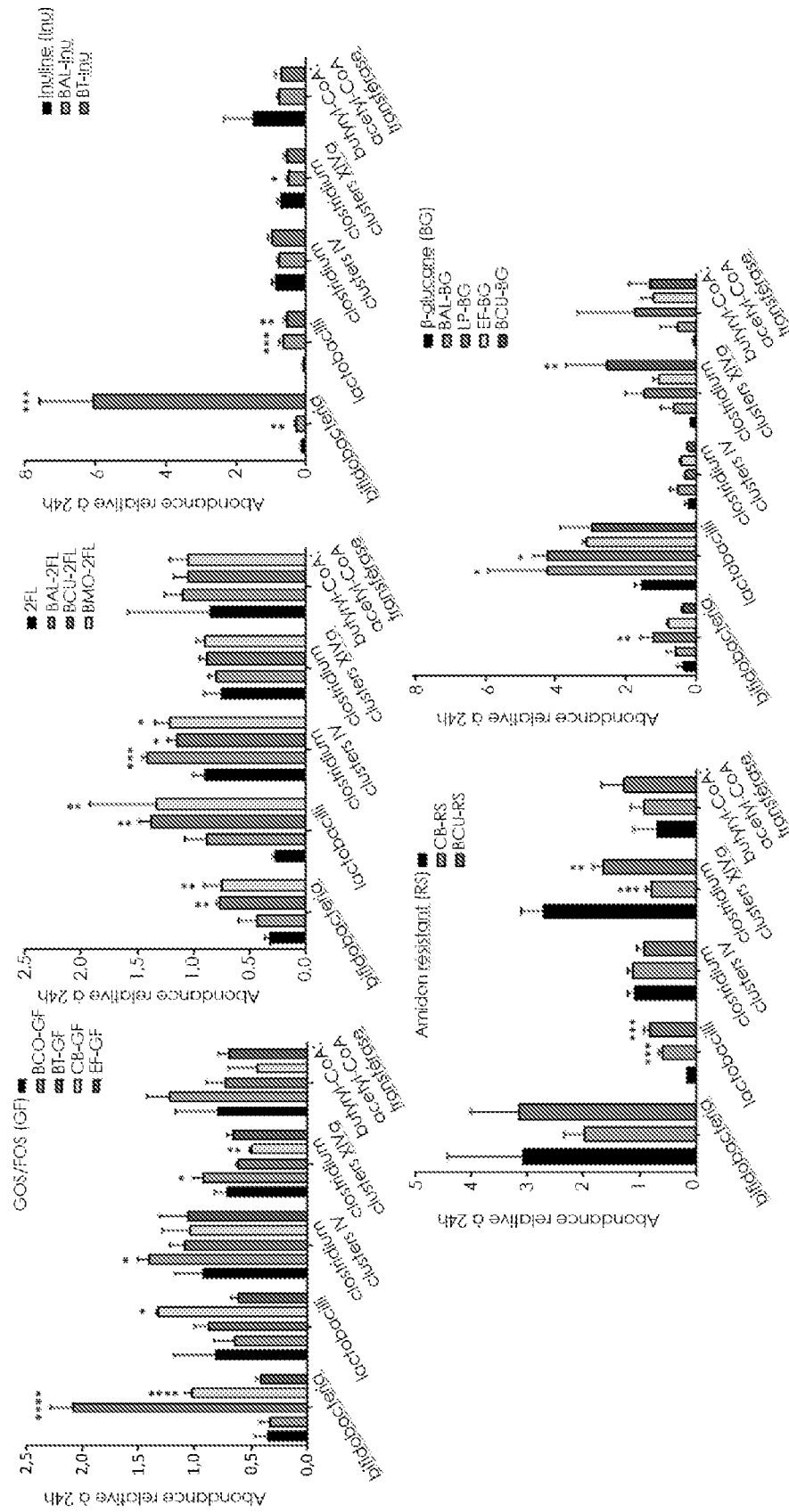


Figure 4

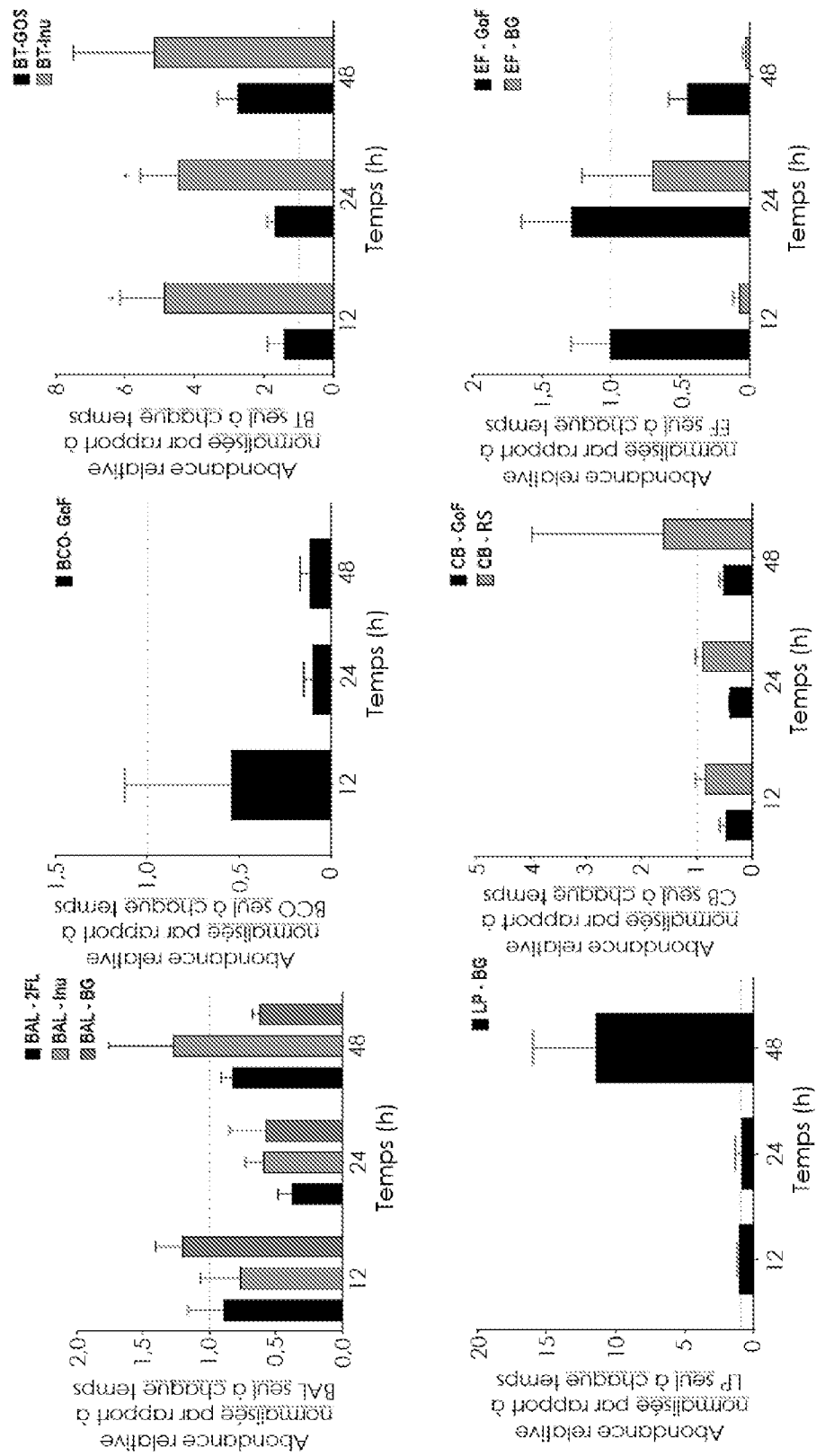


Figure 5

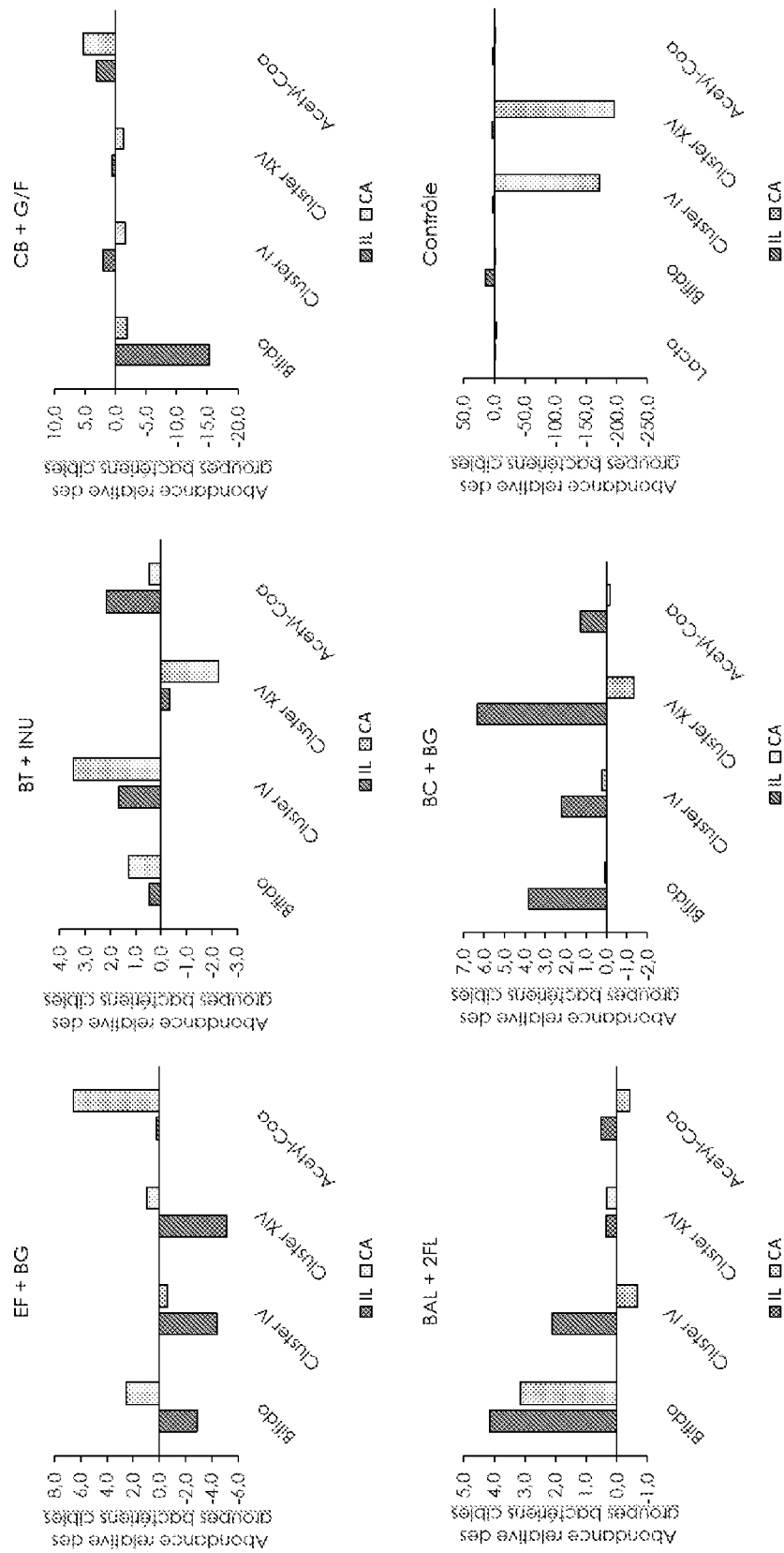


Figure 6

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL ÉTABLI EN VERTU DE L'ARTICLE XI.23., §10 DU CODE DE DROIT ÉCONOMIQUE BELGE

IDENTIFICATION DE LA DEMANDE INTERNATIONALE		REFERENCE DU DEPOSANT OU DU MANDATAIRE	
Demande nationale belge n° 202005828		Date du dépôt 16-11-2020	
		Date de priorité revendiquée	
Déposant (Nom) ARTECHNO SA, et al			
Date de la requête d'une recherche de type international 28-11-2020		Numéro attribué par l'administration chargée de la recherche internationale à la requête d'une recherche de type international SN77499	
I. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE (en cas de plusieurs symboles de la classification, les indiquer tous)			
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB Voir rapport de recherche			
II. DOMAINES RECHERCHES			
Documentation minimale consultée			
Système de classification	Symboles de la classification		
IPC	Voir rapport de recherche		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents font partie des domaines consultés			
III. ☐ IL A ÉTÉ ESTIMÉ QUE CERTAINES REVENDICATIONS NE POUVAIENT FAIRE L'OBJET D'UNE RECHERCHE (Observations sur la feuille supplémentaire)			
IV. ☐ ABSENCE D'UNITÉ DE L'INVENTION ET/OU CONSTATATION RELATIVE À L'ÉTENDUE DE LA RECHERCHE (Observations sur la feuille supplémentaire)			

RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL

Demande de recherche No

BE 202005828

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE				
INV.	A23K10/18	A23K20/163	A23K50/30	A23K50/60
	A23L33/21	A23L33/00	A61K31/702	A61K31/733
	A61K35/742	A61K35/745		A61K35/741
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) A23K 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 réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data				
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS				
Catégorie °	Documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents			no. des revendications visées
X	WO 2018/024440 A1 (NESTEC SA [CH]) 8 février 2018 (2018-02-08) * page 3, ligne 27 - ligne 30; revendications 1, 2, 4, 8 *			1-15
X	US 2004/247582 A1 (BINDER JOHANN [AT] ET AL) 9 décembre 2004 (2004-12-09) * page 1, alinéa [0009] - alinéa [0016] * * page 4, alinéa [0032] - page 5, alinéa [0043]; revendication 14 *			1-13,15
X	WO 2015/164021 A1 (MJN US HOLDINGS LLC [US]) 29 octobre 2015 (2015-10-29) * page 8, alinéa [0044] - page 9, alinéa [0052]; revendications; exemple 2 * * page 2, alinéa [0005] - alinéa [0005] *			1-15
- / - -				
☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents ☒ 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 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, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt ou la date de priorité et n'appartenant 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 de type international a été effectivement achevée			Date d'expédition du rapport de recherche de type international	
11 juin 2021				
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016			Fonctionnaire autorisé Smeets, Dieter	

C.(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie °	Documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	CN 108 323 641 A (SHANGHAI CHOWSING PET PRODUCTS CO LTD) 27 juillet 2018 (2018-07-27) * alinéas [[0004]], [[0007]] *	1-13,15
X	WO 2011/013106 A1 (DANISCO [DK]; BURCELIN REMY [FR] ET AL.) 3 février 2011 (2011-02-03) * page 20, alinéa 5 - page 28, alinéa 2; revendications * * page 6, alinéa 1 - page 8, alinéa 2; exemple 3 *	1-15
X,D	WO 2014/049023 A1 (AQUILON CYL SANIDAD ANIMAL [ES]; UNIV LEON [ES]) 3 avril 2014 (2014-04-03) cité dans la demande * page 29, lignes 1-5; revendications; exemples *	1-15
X,D	WO 2017/156548 A1 (EVOLVE BIOSYSTEMS INC [US]) 14 septembre 2017 (2017-09-14) cité dans la demande * page 10, alinéa [0030]; revendications; exemples *	1-7,9-15
X	WO 2020/150672 A2 (MARS INC [US]; MARSHALL JONES ZOE [GB]) 23 juillet 2020 (2020-07-23) * page 21, ligne 8 - page 24, ligne 33; revendications; exemples *	1,3-7, 9-13,15
X	WO 2020/178391 A1 (MATIVA TECH [CH]) 10 septembre 2020 (2020-09-10) * revendications; exemple 1; tableau 1 *	1,3-7, 9-13,15

RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande de recherche n

BE 202005828

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2018024440	A1	08-02-2018	AU 2017307952 A1 29-11-2018
		CN 109561723 A 02-04-2019	
		EP 3493686 A1 12-06-2019	
		PH 12018502382 A1 08-04-2019	
		RU 2019105764 A 04-09-2020	
		US 2019166897 A1 06-06-2019	
		WO 2018024440 A1 08-02-2018	

US 2004247582	A1	09-12-2004	AT 413191 B 15-12-2005
		AT 469564 T 15-06-2010	
		AU 2003277932 A1 04-05-2004	
		EP 1549155 A1 06-07-2005	
		HK 1080335 A1 28-04-2006	
		JP 2006501828 A 19-01-2006	
		US 2004247582 A1 09-12-2004	
		WO 2004032645 A1 22-04-2004	

WO 2015164021	A1	29-10-2015	AU 2015250268 A1 15-09-2016
		AU 2021200368 A1 18-03-2021	
		CA 2945970 A1 29-10-2015	
		CN 106255505 A 21-12-2016	
		EP 3154376 A1 19-04-2017	
		PH 12016501953 A1 09-01-2017	
		SG 11201607125R A 29-09-2016	
		TW 201625143 A 16-07-2016	
		US 2015305385 A1 29-10-2015	
		WO 2015164021 A1 29-10-2015	

CN 108323641	A	27-07-2018	AUCUN

WO 2011013106	A1	03-02-2011	BR 112012001812 A2 15-03-2016
		CN 102470152 A 23-05-2012	
		DK 2459203 T3 18-02-2019	
		EP 2459203 A1 06-06-2012	
		ES 2708450 T3 09-04-2019	
		PL 2459203 T3 30-04-2019	
		US 2012183516 A1 19-07-2012	
		US 2016113976 A1 28-04-2016	
		WO 2011013106 A1 03-02-2011	

WO 2014049023	A1	03-04-2014	AU 2013322644 A1 09-04-2015
		BR 112015006568 A2 18-12-2018	
		CA 2886244 A1 03-04-2014	
		CN 105283191 A 27-01-2016	
		EP 2900805 A1 05-08-2015	
		JP 6452607 B2 16-01-2019	
		JP 2015530401 A 15-10-2015	
		KR 20150061653 A 04-06-2015	
		NZ 706636 A 26-10-2018	
		RU 2015110450 A 20-11-2016	
		US 2015250833 A1 10-09-2015	
		WO 2014049023 A1 03-04-2014	

WO 2017156548	A1	14-09-2017	AU 2017230185 A1 04-10-2018
		BR 112018068274 A2 15-01-2019	
		CA 3017371 A1 14-09-2017	
		CN 109069549 A 21-12-2018	
		EP 3426269 A1 16-01-2019	

RAPPORT DE RECHERCHE DE TYPE INTERNATIONAL

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande de recherche n

BE 202005828

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
		SG 11201807811R A	30-10-2018
		US 2019069586 A1	07-03-2019
		WO 2017156548 A1	14-09-2017

WO 2020150672	A2	23-07-2020	AUCUN

WO 2020178391	A1	10-09-2020	FR 3093427 A1
		WO 2020178391	A1 10-09-2020



OPINION ÉCRITE

Dossier N° SN77499	Date du dépôt(jour/mois/année) 16.11.2020	Date de priorité (jour/mois/année)	Demande n° BE202005828
Classification internationale des brevets (CIB) INV. A23K10/18 A23K20/163 A23K50/30 A23K50/60 A23L33/135 A23L33/21 A23L33/00 A61K31/702 A61K31/733 A61K35/741 A61K35/742 A61K35/745			
Déposant ARTECHNO SA, et al			

La présente opinion contient des indications et les pages correspondantes relatives aux points suivants :

- ☒ Cadre n° I Base de l'opinion
- ☐ Cadre n° II Priorité
- ☐ Cadre n° III Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- ☐ Cadre n° IV Absence d'unité de l'invention
- ☒ Cadre n° V Déclaration motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- ☐ Cadre n° VI Certains documents cités
- ☐ Cadre n° VII Irrégularités dans la demande
- ☒ Cadre n° VIII Observations relatives à la demande

Formulaire BE237A (feuille de couverture) (Janvier 2007)	Examineur Smeets, Dieter
--	-----------------------------

OPINION ÉCRITE

Demande n°
BE202005828

Cadre n° I Base de l'opinion

1. Cette opinion a été établie sur la base des revendications déposées avant le commencement de la recherche.
2. En ce qui concerne **la ou les séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande, le cas échéant, cette opinion a été effectuée sur la base des éléments suivants :
 - a. Nature de l'élément:
 - ☐ un listage de la ou des séquences
 - ☐ un ou des tableaux relatifs au listage de la ou des séquences
 - b. Type de support:
 - ☐ sur papier
 - ☐ sous forme électronique
 - c. Moment du dépôt ou de la remise:
 - ☐ contenu(s) dans la demande telle que déposée
 - ☐ déposé(s) avec la demande, sous forme électronique
 - ☐ remis ultérieurement
3. ☐ De plus, lorsque plus d'une version ou d'une copie d'un listage des séquences ou d'un ou plusieurs tableaux y relatifs a été déposée, les déclarations requises selon lesquelles les informations fournies ultérieurement ou au titre de copies supplémentaires sont identiques à celles initialement fournies et ne vont pas au-delà de la divulgation faite dans la demande internationale telle que déposée initialement, selon le cas, ont été remises.
4. Commentaires complémentaires :

OPINION ÉCRITE

Demande n°
BE202005828

Cadre n° V Opinion motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications	
	Non : Revendications	1-15
Activité inventive	Oui : Revendications	
	Non : Revendications	1-15
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications	1-15
	Non : Revendications	

2. Citations et explications

voir feuille séparée

Cadre n° VIII Observations relatives à la demande

voir feuille séparée

Ad point V

Déclaration motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle ; citations et explications à l'appui de cette déclaration

- 1 Il est fait référence aux documents suivants :
- D1 WO 2018/024440 A1 (NESTEC SA [CH]) 8 février 2018 (2018-02-08)
 - D2 US 2004/247582 A1 (BINDER JOHANN [AT] ET AL) 9 décembre 2004 (2004-12-09)
 - D3 WO 2015/164021 A1 (MJN US HOLDINGS LLC [US]) 29 octobre 2015 (2015-10-29)
 - D4 CN 108 323 641 A (SHANGHAI CHOWSING PET PRODUCTS CO LTD) 27 juillet 2018 (2018-07-27)
 - D5 WO 2011/013106 A1 (DANISCO [DK]; BURCELIN REMY [FR] ET AL.) 3 février 2011 (2011-02-03)
 - D6 WO 2014/049023 A1 (AQUILON CYL SANIDAD ANIMAL [ES]; UNIV LEON [ES]) 3 avril 2014 (2014-04-03)cité dans la demande
 - D7 WO 2017/156548 A1 (EVOLVE BIOSYSTEMS INC [US]) 14 septembre 2017 (2017-09-14)cité dans la demande
 - D8 WO 2020/150672 A2 (MARS INC [US]; MARSHALL JONES ZOE [GB]) 23 juillet 2020 (2020-07-23)
 - D9 WO 2020/178391 A1 (MATIVA TECH [CH]) 10 septembre 2020 (2020-09-10)

2 Traitement thérapeutique

La revendication 15 concerne une méthode de traitement thérapeutique du corps animal. Par conséquent, son objet n'est pas brevetable. Cependant, les revendications ayant pour objet un produit, notamment des substances ou compositions destinées à être utilisées dans un premier traitement médical ou tout traitement médical suivant peuvent être acceptées.

La brevetabilité, en particulier la nouveauté et l'activité inventive, de la revendication 15 a été évaluée sur la base d'une revendication de produit proposée à une fin spécifique en prenant en considération les effets allégués du de la composition.

3 Manque de clarté

- 3.1 La présente revendication 1 couvre des combinaisons d'un prébiotique et d'un probiotique définis seulement par leur fonction synergétique souhaitée, ce qui est contraire à l'exigence de clarté, étant donné qu'une définition du type "résultat recherché" ne permet pas de déterminer la portée de la revendication. Le fait que chaque combinaison puisse être testé ne lève pas cette objection car, mis à part les combinaisons spécifiques divulguées dans la revendication 8, l'homme du métier ne saurait pas de prime abord si une combinaison d'un prébiotique et un probiotique particulier entrerait dans le cadre de la portée revendiquée. Un nombre excessif d'essais serait nécessaire afin de tester aléatoirement les combinaisons.

En outre, l'effet désiré n'est pas clairement défini, car la revendication ne contient aucune méthode permettant de déterminer la portée exacte d'un "environnement anti-inflammatoire".

Donc, la revendication 1 est interprétée au sens le plus large, couvrant chaque combinaison d'un probiotique et d'un prébiotique pour utilisation dans une méthode permettant de traiter ou de prévenir la dysbiose.

Une dysbiose du microbiote intestinal correspondant à un déséquilibre ou une mauvaise adaptation microbienne du microbiote intestinal et peut être associée à de nombreuses pathologies. Donc, la méthode de la revendication 1 couvre chaque traitement permettant de modifier la composition du microbiote intestinal et ainsi permettre de rétablir son équilibre et/ou de garder son équilibre (=prévention).

Il est considéré également que le simple fait d'expliquer qu'un effet est obtenu lorsque l'on utilise une combinaison connue, et ce, même si cette explication porte sur un effet pharmaceutique dont on ignorait qu'il était dû à la présence de ce composé dans la composition connue, ne saurait conférer un caractère de nouveauté à un procédé connu, si l'homme du métier a déjà utilisé cette combinaison pour le traitement revendiqué "pour le traitement ou la prévention de la dysbiose".

- 3.2 L'objet des revendications 4-7 ne satisfait également pas à l'exigence de clarté, car l'objet de la protection demandée n'est pas clairement défini. Ces revendications tentent également de définir l'objet par le résultat recherché, ce qui revient simplement à énoncer le problème sous-jacent, sans indiquer les caractéristiques techniques nécessaires pour parvenir à ce résultat.

Il est considéré que chaque combinaison d'un probiotique et d'un prébiotique génère implicitement l'effet désirée dans ces revendications.

4 Manque de nouveauté

- 4.1 D1 (page 3, ligne 27 - ligne 30; revendications 1, 2, 4, 8) divulgue une composition comprenant GOS et *B. animalis* spp. *lactis* et d'autres probiotiques et/ou probiotiques pour le traitement de la dysbiose causant de la diarrhée. Cette composition peut être incorporé dans une formulation pour nouveau-né. Donc, ce document anticipe l'objet des revendications 1-7, 9-15.
- 4.2 D2 (page 1, alinéa [0009] - alinéa [0016]; page 4, alinéa [0032] - page 5, alinéa [0043]; revendication 14) divulgue une composition comprenant inuline et/ou, FOS, *B. thermophilum* et d'autres probiotiques pour la prévention de la colonisation de l'intestin par des pathogènes (= prévenir la dysbiose). Donc, ce document anticipe l'objet des revendications 1-13, 15.
- 4.3 D3 (page 8, alinéa [0044] - page 9, alinéa [0052]; revendications; exemple 2; page 2, alinéa [0005] - alinéa [0005]) divulgue une composition synergétique comprenant un probiotique et un prébiotique pour stimuler la santé intestinale. Comme probiotique, il est divulgué le *B. animalis* spp. *lactis*; comme prébiotique il est divulgué les bêta-glucanes, HMOs et PUFA. La composition est administré à des porcelets. Donc, ce document anticipe l'objet des revendications 1-7, 9-15.
- 4.4 D4 (alinéas [0004], [0007]) divulgue une composition pour réguler la fonction intestinale chez les animaux, comprenant *C. butyricum*, GOS et d'autres prébiotiques et probiotiques. Donc, ce document anticipe l'objet des revendications 1-13 et 15. Donc, ce document anticipe l'objet des revendications 1-13, 15.
- 4.5 D5 (page 20, alinéa 5 - page 28, alinéa 2; revendications; page 6, alinéa 1 - page 8, alinéa 2; exemple 3) divulgue une combinaison de *B. animalis* et prebiotiques (inuline/FOS) pour traiter la dysbiose. La composition peut être incorporé dans des produits laitiers. Donc, ce document anticipe l'objet des revendications 1-7, 9-15.

- 4.6 D6 (page 29, lignes 1-5; revendications; exemples) divulgue une composition pour la prévention de la diarrhée bactérienne (et donc la dysbiose) chez les porcelets, comprenant 2 souches de *E. faecium*, bêta-glucane et inuline. Donc, ce document anticipe l'objet des revendications 1-15.
- 4.7 D7 (page 10, alinéa [0030]; revendications; exemples) divulgue une composition pour nouveau-né, comprenant *Bifidobacterium* et HMOs, pour le traitement de la dysbiose. Donc, ce document anticipe l'objet des revendications 1-7, 9-13, 15.
- 4.8 D8 (page 21, ligne 8 - page 24, ligne 33; revendications; exemples) divulgue une composition comprenant des prébiotiques, des probiotiques (*Bifidobacterium*) pour le traitement ou la prévention de la dysbiose. Donc, ce document anticipe l'objet des revendications 1, 3-7, 9-13, 15.
- 4.9 D9 (revendications; exemple 1; tableau 1) divulgue une composition pour le traitement ou la prévention de la dysbiose, comprenant des sources des probiotiques et de prébiotiques(acides gras oméga 3, fibres). Donc, ce document anticipe l'objet des revendications 1, 3-7, 9-13 et 15.
- 5 Manque d'activité inventive
- La question de savoir si l'objet des revendications 1-15 implique une activité inventive n'est que pertinente lorsque les conditions de nouveauté et de clarté sont remplies.

Ad point VIII

Certaines observations relatives à la demande

Voir Ad point V, par. 3