

①②

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 11.05.00.

③⑦ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 16.11.01 Bulletin 01/46.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : INSTITUT NATIONAL DE LA
RECHERCHE AGRONOMIQUE INRA — FR et UNI-
VERSITÉ D'Auvergne — FR.

⑦② Inventeur(s) : RENAUD MICHEL et BERNALIER
ANNICK.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : REGIMBEAU.

⑤④ UTILISATION DE SOUCHES ACETOGENES HYDROGENOTROPHES POUR LA PREVENTION OU LE
TRAITEMENT DE TROUBLES DIGESTIFS.

⑤⑦ La présente invention concerne l'utilisation de sou-
ches bactériennes acétogènes hydrogénotrophes non pa-
thogènes pour la préparation d'une composition destinée au
traitement ou à la prévention des troubles gastro-intestinaux
associés aux productions de gaz digestifs et/ ou à moduler
l'équilibre microbien de l'écosystème digestif chez un mam-
mifère. L'invention concerne également lesdites composi-
tions pharmaceutiques ou alimentaires, ainsi que des
procédés de suivi et de préparation desdites souches.



L'invention concerne l'utilisation de souches bactériennes acétogènes
5 hydrogénotrophes non pathogènes pour la préparation d'une composition destinée
au traitement ou à la prévention des troubles gastro-intestinaux associés aux
productions de gaz digestifs et/ou à moduler l'équilibre microbien de l'écosystème
digestif chez un mammifère.

La prévalence des troubles digestifs fonctionnels ou colopathies
10 fonctionnelles dans la population occidentale est très élevée puisque l'on estime
qu'ils touchent environ 25% à 30% de la population adulte. De plus, ces troubles
digestifs représentent une des causes majeures de consultation en gastro-entérologie
(environ 50% des consultations). Les symptômes de ces troubles intestinaux sont
divers comme la modification du transit intestinal, le météorisme, les douleurs
15 abdominales, le ballonnement. L'origine de ces troubles fonctionnels reste pour le
moment mal définie mais l'on estime que les gaz produits lors de la digestion dans
le côlon jouent un rôle important dans la genèse de certains symptômes comme
l'excès de flatulences, la distension abdominale (ballonnement) et les douleurs
associées. Certains traitements ont été proposés comme le charbon actif, la
20 simethicone, la smectite, des antispasmodiques ainsi que certains compléments
alimentaires à base de ferments (*Saccharomyces cerevisiae*, *Bifidobacterium*,
Lactobacillus), de plantes ou de fibres (oligofructose, fenouil, algues, avoine,
agrumes...) ou de structure minérale (Octalite...). Ces traitements présentent
toutefois une faible efficacité sur les symptômes liés à la formation des gaz au
25 niveau du côlon, et n'agissent pas de manière sélective. La présente invention se
propose de remédier aux inconvénients de l'art antérieur, tant sur le plan du
traitement que sur le plan de la prévention de l'inconfort digestif associé aux
productions de gaz colique.

Pour ce faire, l'invention s'appuie à la fois sur les caractéristiques
30 physiologiques des bactéries acétogènes hydrogénotrophes, à savoir leur capacité à
réduire le volume total des gaz fermentaires digestifs (H_2 et CO_2) et sur leur
diversité nutritionnelle qui leur confère un avantage écologique important dans
l'écosystème digestif par rapport aux autres microorganismes hydrogénotrophes.

Chez l'homme, les glucides alimentaires qui échappent à la digestion et l'absorption dans l'intestin grêle arrivent dans le côlon où ils sont fermentés par une microflore complexe. Cette dégradation anaérobie de la matière organique produit des métabolites terminaux sous forme d'acides gras volatiles ayant des propriétés
5 métaboliques (acétate, propionate) ou trophiques (butyrate) ainsi que des gaz (H_2 , CO_2 et, chez certains individus, CH_4).

Parmi ces gaz fermentaires, H_2 joue un rôle important dans le maintien et l'efficacité de la dégradation de la matière organique dans le côlon humain. Une partie de H_2 est éliminée par les voies respiratoires et rectales, mais la plus grande
10 fraction de ce gaz est réutilisée *in situ* par la flore intestinale. Cette dernière, appelée flore hydrogénotrophe, est composée de bactéries acétogènes, de bactéries sulfato-réductrices et d'archæa méthanogènes.

On trouve les bactéries sulfato-réductrices dans la microflore digestive de tous les individus (Pochart et al. (1992) FEMS Microbiol. Lett. 98 p225). Elles
15 synthétisent H_2S qui est un produit potentiellement toxique pour les cellules eucaryotes, et qui serait impliqué dans certaines maladies du système digestif, en particulier les colites ulcéreuses (Roediger et al. (1993), Gastroenterology, 104, p802).

Les archæa méthanogènes produisent du CH_4 qui est un gaz non toxique.
20 Cette production de méthane n'est observée que chez une fraction de la population humaine (environ 21% des indiens adultes, 95% de la population rurale d'adolescents d'Afrique noire et 40% de la population occidentale) et son élimination se fait par voie respiratoire et dans les flatulences (Segal et al. (1988) Gut 29 p608; Pochart et al. (1992) FEMS Microbiol. Lett. 98 p225). Ces individus,
25 appelés méthano-excréteurs, hébergent une population d'archæa méthanogènes très importante ($>10^8$ /g d'extrait fécal sec) (Durand et al. (1996) in: Mätkki Y and Cummings JH (eds) Official Publications of the European Communities, p58). Chez ces sujets, la méthanogénèse est la principale voie d'élimination de H_2 .

Les individus non méthano-excréteurs réutilisent H_2 par des mécanismes
30 alternatifs, parmi lesquels l'acétogénèse réductrice. Cette voie constitue un processus métabolique majeur d'utilisation de H_2 chez les non méthano-excréteurs. Des études ont en effet montré que la microflore fécale des sujets non méthano-excréteurs métabolise principalement H_2 et CO_2 en acétate, alors que celle

des sujets méthano-excréteurs utilisent H_2 et CO_2 pour former du méthane (Lajoie et al. (1988) Appl. Environ. Microbiol. 54 p2733 ; Bernalier et al. (1996) FEMS Microbiol. Ecol. 19 pl93). En parallèle, Doré et al. (1995 FEMS Microbiol. Ecol. 17 p279) ont montré l'existence d'une corrélation négative entre le nombre d'archæa méthano-gènes et celui des bactéries acétogènes dans le côlon humain. Les individus non méthano-excréteurs hébergent donc peu ou pas d'archæa méthano-gènes dans le côlon, ce qui permettrait une expression maximale de leur activité acétogène (Lajoie et al. (1988) Appl. Environ. Microbiol. 54 p2733 ; Bernalier et al. (1996) FEMS Microbiol. Ecol. 19 pl93).

10 La flore acétogène hydrogénotrophe se caractérise par une grande diversité taxonomique. Elle est composée d'espèces bactériennes appartenant en particulier aux genres *Clostridium*, *Ruminococcus* et *Streptococcus* (Bernalier et al. (1996) Curr. Microbiol. 33 p94) ainsi que de certaines espèces du genre *Eubacterium* (Schink (1994) in: Drake HL (ed) Acetogenesis. New-york: Chapman and Hall
15 p197).

Par « bactéries acétogènes hydrogénotrophes », on entend les espèces bactériennes utilisant la voie réductrice de synthèse de l'acétate (ou voie de Wood-Ljungdahl) pour produire ce métabolite lors de leur croissance autotrophe à partir de H_2/CO_2 ainsi que lors de leur croissance hétérotrophe, à partir d'un substrat
20 organique. Ces bactéries acétogènes hydrogénotrophes présentent en effet une grande capacité nutritionnelle et sont capables, outre d'utiliser H_2/CO_2 , de fermenter un nombre important d'oses et de composés organiques (Bernalier et al (1996), Curr. Microbiol., 33 p94).

Les souches bactériennes acétogènes hydrogénotrophes selon l'invention
25 produisent des acides gras à chaîne courte (AGCC), en particulier de l'acétate, à partir des gaz H_2 et CO_2 . Cette production d'AGCC présente un avantage physiologique pour l'hôte, comme la prévention (protection) ou le traitement de pathologies diverses (voir ci-dessous).

La présence simultanée de composés organiques et de H_2/CO_2 dans le milieu
30 de culture (conditions équivalentes à celles rencontrées dans le côlon humain) peut se traduire par une utilisation simultanée des deux substrats par la souche acétogène hydrogénotrophe (Breznak and Blum (1991), Arch. Microbiol., 156 p105). Ce

phénomène appelé mixotrophie, permet à la bactérie d'avoir un rendement énergétique plus élevé et donc de croître plus rapidement.

Cette aptitude à consommer H_2/CO_2 associée à la capacité d'utilisation d'un grand nombre de substrats organiques ainsi que la capacité à croître par mixotrophie, confère donc un avantage écologique important aux bactéries
5 acétogènes par rapport aux populations de méthanogènes qui n'utilisent qu'un nombre restreint de substrats (H_2 , formate), et sulfatoréductrices dépendantes de la présence de sulfate pour leur métabolisme de H_2 .

Il a été montré que l'utilisation de certaines préparations probiotiques,
10 contenant des bactéries telles que des bactéries propioniques, lactobacilles, et/ou bifidobactéries, permet de modifier la flore colique de certains patients (Bougle et al. (1999) Scand. J. Gastroenterol. 34 p144 ; Venturi et al. (1999) Aliment. Pharmacol. Ther. 13 p1103)

L'utilisation des bactéries acétogènes en tant que probiotiques comme
15 définis par Fuller (1989, J. Appl. Bact., 66 p365), dans des préparations qui peuvent être utilisées en tant qu'aliments ou en tant que suppléments alimentaires, s'avère donc être une voie d'intérêt particulièrement novatrice, car leur capacité à métaboliser H_2/CO_2 permettrait d'optimiser les fermentations coliques en diminuant le volume total des gaz fermentaires et en produisant de l'acétate, source d'énergie
20 métabolisable par l'hôte. La réduction des gaz digestifs serait ainsi un moyen efficace de prévention et/ou de traitement des troubles digestifs liés à l'accumulation de ces gaz.

La présente invention a donc pour objet l'utilisation de souches acétogènes hydrogénotrophes non pathogènes pour réguler les susdits désordres digestifs et/ou
25 moduler l'équilibre de la flore microbienne chez un mammifère.

Les mammifères selon la présente invention sont de préférence les mammifères monogastriques, par opposition aux mammifères polygastriques comme les ruminants. On entend en particulier les félins et canins, en particulier les mammifères domestiques (chats et chiens), ainsi que l'homme.

30 Par « non pathogène », on entend une espèce microbienne pour laquelle aucune pathologie de l'hôte associée à sa présence n'a pu être mise en évidence (souche GRAS = Generally Recognized As Safe).

Une telle utilisation peut être envisagée de différentes façons. La présente invention concerne une utilisation prophylactique ou thérapeutique, afin de prévenir et/ou traiter certains troubles de l'appareil digestif. Cette prévention et/ou traitement peut s'effectuer par l'intermédiaire d'une régulation des gaz produits dans le côlon, 5 grâce à la modulation de la flore microbienne. Une utilisation de ce type peut être envisagée sous la direction d'un médecin ou d'un professionnel de santé. Dans ce cas, le dosage, la durée du traitement, ainsi qu'une association éventuelle de la souche acétogène hydrogénotrophe non pathogène avec d'autres principes actifs efficaces pour la prévention et/ou le traitement des troubles digestifs visés, sont 10 décidés par le professionnel de santé. Une telle utilisation peut également nécessiter un suivi de la souche acétogène hydrogénotrophe non pathogène par un procédé d'analyse selon l'invention, tel que défini plus loin.

La présente invention concerne également une utilisation thérapeutique et/ou prophylactique dans laquelle l'utilisateur décide lui-même de l'administration de la 15 souche acétogène hydrogénotrophe non pathogène. Le but recherché est alors de diminuer l'inconfort de l'utilisateur, qui désire par exemple améliorer sa qualité de vie.

En effet, les troubles digestifs visés par la présente invention affectent la qualité de vie des patients qui en sont atteints. Le degré d'inconfort digestif 20 engendré et/ou la capacité de chacun à supporter ces troubles expliquent que les personnes atteintes consultent ou non un médecin.

En particulier, l'invention concerne l'utilisation de souches acétogènes hydrogénotrophes pour la préparation d'une composition pour les applications suivantes :

- 25 (1) la prévention et/ou le traitement des troubles fonctionnels digestifs,
 (2) la modulation de l'équilibre de la flore microbienne colique en favorisant
 avantageusement l'activité de la flore bactérienne acétogène, en
 particulier au détriment des flores bactériennes méthanogènes et
 sulfato-réductrices.

30 Ce dernier point a pour intérêt :

- (1) de diminuer la formation du gaz CH_4 ,
 (2) de diminuer la production de H_2S , produit toxique, impliqué dans
 l'initiation et/ou le développement de pathologies digestives,

(3) de favoriser la production de métabolites sains pour l'hôte.

En particulier, on utilise une souche du genre *Ruminococcus*, *Clostridium* ou *Streptococcus*, de façon préférée *Ruminococcus hydrogenotrophicus*.

Ainsi, la présente invention concerne l'utilisation d'au moins une souche
5 bactérienne acétogène hydrogénotrophe non pathogène pour la préparation d'une composition destinée à la prévention et/ou au traitement des troubles gastro-intestinaux en réduisant la formation de gaz potentiellement toxiques et/ou à la modulation de l'équilibre microbien de l'écosystème digestif chez un mammifère. De telles compositions, alimentaires ou pharmaceutiques, sont également objets de
10 la présente invention.

Ladite réduction et/ou ladite modulation s'effectue par la diminution du taux d'hydrogène gazeux (H_2) et/ou de dioxyde de carbone gazeux (CO_2) produit lors des fermentations digestives.

Ladite réduction et/ou modulation peut également s'effectuer par
15 l'augmentation de l'activité de la flore colique acétogène au détriment de la flore méthanogène et/ou sulfato-réductrice.

Les troubles gastro-intestinaux, que l'utilisation d'une composition contenant au moins une souche bactérienne acétogène hydrogénotrophe se propose de réduire, sont compris dans le groupe des colopathies fonctionnelles, et en particulier les
20 flatulences excessives, le météorisme, les ballonnements, les douleurs abdominales, critères majeurs caractérisant le syndrome de l'intestin irritable. La composition contenant au moins une souche bactérienne acétogène hydrogénotrophe peut également être utilisée dans les cas de colites ulcéreuses, de maladies inflammatoires intestinales ou de la maladie de Crohn afin de réduire le volume des
25 gaz coliques, facteur aggravant les symptômes de ces pathologies.

Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, ladite composition est une composition alimentaire susceptible d'être utilisée dans l'élaboration de nouveaux aliments ou ingrédients alimentaires tels que définis dans le règlement CE n°258/97, et notamment dans la fabrication d'aliments fonctionnels. Un aliment
30 peut être considéré comme fonctionnel si l'on démontre de façon satisfaisante qu'il exerce un effet bénéfique sur une ou plusieurs fonctions cibles dans l'organisme, au delà des effets nutritionnels habituels, en améliorant l'état de santé et de bien être et/ou en réduisant le risque d'une maladie (Diplock et al. Scientific concepts of

fonctional foods in Europe : consensus document, British Journal of Nutrition, 1999, 81, S1-S27).

Ladite composition peut en particulier constituer un probiotique conditionné par exemple sous forme de capsule ou de gélule.

- 5 On peut ainsi utiliser une composition alimentaire selon l'invention qui contient une souche acétogène hydrogénotrope non pathogène, et qui apporte un bien-être à l'utilisateur par la réduction de l'inconfort digestif.

Dans un autre mode de réalisation préféré de l'invention, ladite composition est une composition pharmaceutique, associée en outre à un support
10 pharmaceutiquement acceptable, qui peut comprendre des excipients. Son mode d'administration s'effectue de préférence par voie orale ou directement *in situ*, en particulier par coloscopie, ou par voie rectale par l'intermédiaire de suppositoires.

Dans un autre mode de réalisation de l'invention, la composition pharmaceutique comprend en outre au moins un autre agent actif contre au moins
15 une des pathologies visées.

La composition pharmaceutique ou alimentaire selon l'invention peut être administrée par voie orale, sous forme de gélules, de capsules, de comprimés, de poudres, de granules ou de solutions ou suspensions orales. On peut mélanger la au moins une souche bactérienne avec des excipients classiques tels que la gélatine,
20 l'amidon, le lactose, le stéarate de magnésium, le talc, la gomme arabique et analogues. Il peut également être avantageux d'utiliser des excipients moins classiques, qui permettent d'augmenter la capacité de la au moins une souche bactérienne utilisée à être active dans le côlon. Par exemple, on peut ajouter du cellobiose, du maltose, du mannose, de la salicine, du tréhalose, de l'amygdaline, de
25 l'arabinose, du mélobiose, du rhamnose et/ou du xylose. Cette liste n'est pas exhaustive et les substrats sont choisis et adaptés en fonction de la souche considérée. Ces substrats peuvent favoriser la croissance hétérotrophe et/ou mixotrophe de la au moins une souche acétogène présente dans la composition.

Ainsi, de façon préférée, la composition comprend au moins un additif qui
30 favorise l'activité de la au moins une souche dans l'environnement digestif.

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, la au moins une souche bactérienne acétogène hydrogénotrophe non pathogène présente dans la composition pharmaceutique et/ou alimentaire est administrée sous une forme lui

permettant d'être active dans le côlon. En particulier, il est nécessaire que la au moins une souche bactérienne acétogène hydrogénotrophe non pathogène soit vivante, ou viable dans le tractus digestif, et en particulier le côlon. On peut également, après production de la au moins une souche bactérienne acétogène
5 hydrogénotrophe non pathogène et en fonction des procédés de production, maintenir celle-ci dans des conditions de conditionnement anaérobie, afin de lui permettre de rester viable.

Dans un mode de réalisation préféré, la au moins une souche bactérienne acétogène hydrogénotrophe non pathogène est conditionnée dans un environnement
10 anaérobie, c'est à dire que celle-ci est conditionnée dans une atmosphère exempt d'oxygène.

Dans un autre mode de réalisation préférée de l'invention, la au moins une souche bactérienne acétogène hydrogénotrophe non pathogène présente dans la composition est une souche autologue dudit mammifère, c'est à dire qu'elle peut
15 être isolée dans l'appareil digestif, en particulier dans les fèces d'autres mammifères appartenant au même genre.

D'une manière préférée, et en particulier lorsque le mammifère est l'homme, la au moins une souche bactérienne acétogène hydrogénotrophe non pathogène appartient au genre *Ruminococcus*, de manière encore plus préférée à l'espèce
20 *Ruminococcus hydrogenotrophicus*. On peut également utiliser d'autres bactéries acétogènes hydrogénotrophes, en particulier des bactéries du genre *Streptococcus* ou *Clostridium*, en particulier *Clostridium coccoïdes*.

L'invention concerne également un procédé de suivi spécifique de la souche bactérienne acétogène hydrogénotrophe non pathogène dans le tractus digestif d'un
25 mammifère, comprenant les étapes suivantes :

- a. on définit une séquence nucléotidique spécifique (sonde) de la souche acétogène hydrogénotrophe non pathogène que l'on désire détecter ;
- b. on effectue la détection et/ou quantification de ladite souche par
30 hybridation de la sonde avec de l'acide nucléique total extrait de la flore fécale ou avec les bactéries fécales fixées sur une lame.

Afin de mettre en œuvre un tel procédé de suivi, on peut développer des trousse de diagnostic, qui sont également objets de la présente invention. De telles

trousses contiennent en particulier un « étalon » afin de pouvoir évaluer la quantité de bactéries dans les fèces.

L'homme du métier sait définir une séquence spécifique, qui ne s'hybride pas avec l'ADN d'autres bactéries. De même, l'homme du métier choisira
5 l'hybridation sur membrane ou l'hybridation *in situ* en fonction des moyens dont il dispose, et de la précision recherchée.

De préférence, l'acide nucléique détecté est l'ADN bactérien total, mais peut également être un mélange d'ADN ou d'ARN, ou l'ARN bactérien seul.

On peut également étudier la présence de la au moins une souche
10 bactérienne acétogène hydrogénotrophe non pathogène, par d'autres méthodes. Une détection des acides nucléiques (ADN et/ou ARN) de la au moins une souche bactérienne acétogène hydrogénotrophe non pathogène dans les fèces du mammifère, en particulier par PCR, RT-PCR ou par hybridation avec des sondes spécifiques (Southern ou Northern) permettra de détecter la présence de ladite
15 souche, et éventuellement l'expression de certains gènes. Une séquence spécifique avantageuse peut être choisie dans la séquence du gène codant pour l'ARNr 16S, en particulier une zone qui n'est pas présente sur les autres espèces de la flore colique.

L'invention couvre également un procédé de production d'une souche bactérienne acétogène hydrogénotrophe non pathogène, caractérisé en ce qu'il
20 comprend les étapes suivantes :

- a. on effectue la croissance de la souche sur un milieu adapté, en condition d'anaérobiose stricte, en présence d'un substrat carboné et/ou de H_2/CO_2 comme source d'énergie ;
- b. on récupère les cellules bactériennes ;
- 25 c. on conditionne les cellules bactériennes suivant la forme galénique choisie.

La croissance de la souche aura lieu de préférence dans un milieu AC21 modifié (décrit dans l'exemple 1), à 37 °C, dans un fermenteur. Le substrat carboné peut être le glucose.

30 Une méthode préférée de récupération des cellules bactériennes est la centrifugation, par exemple entre 10000g et 15000g, avantageusement 12000g, pendant 15 à 20 minutes. L'homme du métier sait optimiser ces paramètres.

On peut avantageusement laver les bactéries entre les étapes b et c, en particulier dans un tampon phosphate anaérobie, en resuspendant les cellules, agitant et une nouvelle étape de centrifugation.

Le culot bactérien lavé ou non est conditionné en fonction de la forme galénique choisie. Une méthode avantageuse est la lyophilisation.

Les exemples qui suivent permettent d'illustrer l'invention, mais ne doivent pas pour autant être considérés comme limitatifs.

Exemple 1 : Isolement des micro-organismes

On utilise des échantillons fécaux humains provenant de volontaires sains, non méthano-excréteurs. Les individus sont considérés comme non méthano-excréteurs lorsque leur taux de méthane expiré n'excède pas plus de 1 ppm celui de l'air ambiant qui est de 1,8 ppm (Bond et al. (1970) Gastroenterology 58 p 1035), et que le nombre de méthanogènes contenu dans leurs extraits fécaux est inférieur à 10^7 /g d'extrait fécal (Bernalier et al. (1996) Arch Microbiol. 166 pl76). Le taux de méthane est déterminé à l'aide d'un chromatographe équipé d'un détecteur à ionisation de flamme. Les échantillons fécaux fraîchement prélevés sont conservés à 4°C sous anaérobiose stricte pendant 10 heures au maximum.

L'enrichissement, l'isolement et la culture des micro-organismes sont effectués sur un milieu semi-synthétique, le milieu AC-21 modifié (Breznak et al. (1988) Arch. Microbiol. 150 p282) sous anaérobiose stricte (Hungate (1969) in: Norris JR and Gibbons DW (eds) Methods in microbiology Vol. 3B, New-york: Academic Press p117). La composition par litre du milieu semi-synthétique est la suivante:

25	KH ₂ PO ₄	0,2 g
	NH ₄ Cl	0,25 g
	KCl	0,5 g
	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,15 g
	MgCl ₂ .6H ₂ O	0,6 g
30	Na ₂ SO ₄	0,1 g
	Extrait de levure	0,5 g
	Tryptone	2 g
	Solution d'oligo-éléments	1 ml

	Solution Tungstate-Sélénium	0,1 ml
	Solution de vitamines	5 ml
	Solution de Resazurine (1%, w/v)	1 ml
	NaHCO ₃ (1 M)	30 ml
5	Solution réductrice Cystéine/Sulfure (1,25%/1,25%, w/v)	20 ml

La solution d'oligo-éléments est préparée d'après Widdel et al. (1983, Arch. Microbiol., 134,p286), et la solution de vitamines est préparée d'après Greening et Leedle (1989, Arch. Microbiol., 151, p399). La solution de Tungstate-Sélénium possède la composition suivante : 0,1 mM Na₂WO₄ et 0,1 mM Na₂SeO₃, dans NaOH 20 mM.

Le milieu semi-synthétique est solidifié par l'ajout d'un agent gélifiant (Agar à 2%). Après inoculation, le gaz du milieu de culture est remplacé par H₂/CO₂ ou N₂/CO₂ en fonction du test envisagé.

Le milieu de dilution est un milieu anaérobie purement minéral (Doré et al. (1995) FEMS Microbiol. Lett. 130 p7). A partir d'un échantillon fécal, une suspension mère est réalisée (diluée au dixième, w/v). Une série de dilutions décimales est effectuée à partir de la suspension mère. Les dilutions ainsi réalisées sont inoculées dans le milieu semi-synthétique liquide contenant H₂/CO₂ (60: 40, v/v, 202kPa) comme seule source d'énergie (Doré et al. (1995) FEMS Microbiol. Lett. 130 p7 ; Bernalier et al. (1996) FEMS Microbiol. Ecol. 19 p193 ; Bernalier *et al.* (1996) Curr. Microbiol. 33 p94). Après incubation à 37 °C pendant 20 jours, les enrichissements sont obtenus à partir des tubes de dilution les plus élevées et présentant une croissance bactérienne, une consommation de gaz et une production stœchiométrique d'acétate les plus élevées (Bernalier et al. (1996) Curr. Microbiol. 33 p94). La diminution de la pression de gaz dans les cultures est déterminée par mesure directe de la pression partielle avec un manomètre de type Capshuelic (Dwyer, Instruments, Michigan City, Mich., USA). Après trois transferts des cultures enrichies, des colonies bactériennes sont isolées par la méthode des Roll-tubes (Hungate (1969) in: Norris JR and Gibbons DW (eds) Methods in microbiology Vol. 3B, New-york: Academic Press p117) contenant un milieu homologue gélifié et H₂/CO₂ comme source d'énergie. Après 20 jours d'incubation à 39°C, les colonies sont transférées dans des milieux liquides. La purification des cultures est obtenue après 3 à 5 transferts successifs en Roll-tubes, au terme

desquels la pureté des cultures est déterminée par microscopie à contraste de phase, après coloration de Gram.

L'ADN total des souches acétogènes hydrogénotrophes isolées est extrait par la méthode de Lawson et al (1989, FEMS Microbiol. Lett. 65 p41). Le gène codant pour l'ARN ribosomal 16S est ensuite amplifié par PCR à l'aide des primers universels ARI et pH. Les produits de PRC sont purifiés puis séquencés à l'aide d'un kit de séquence « Dye-Dideoxy Terminator cycle Sequence » et d'un séquenceur automatique Applied Biosystem modèle 373A. La recherche d'homologie de séquence ARNr 16S entre les souches acétogènes isolées et les autres espèces est effectuée grâce au programme FASTA, les bases de données de séquences étant celles de l'EMBL et du RDP, et en utilisant les paramètres de base suggérés. Les alignements de séquence sont vérifiés manuellement.

Par cette méthode, une bactérie du genre *Ruminococcus* a pu être isolée et identifiée à l'espèce *Ruminococcus hydrogenotrophicus*. Cette bactérie a été déposée à la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (Braunschweig, Allemagne) sous le numéro DSM 10507.

Exemple 2 : Etude des caractères généraux

- 1- Le type membranaire des bactéries est déterminé par coloration Gram (méthode conventionnelle) et par le test KOH d'après Buck (1982 App. Environ. Microbiol. 44 p992).
- 2- L'activité catalase est mesurée en mélangeant 1 ml de suspension bactérienne avec quelques gouttes de H₂O₂ (30%). La production de bulles de gaz se dégageant de façon plus ou moins intense indique la présence d'une catalase.
- 3- L'activité cytochrome oxydase est étudiée en plaçant une colonie bactérienne sur un disque de papier filtre saturé avec du diméthyl-p-phénylène diamine. Une coloration rouge pourpre survenant immédiatement sur le disque indique que le test est positif.
- 4- Les caractéristiques morphologiques des cultures sont étudiées par microscopie à contraste de phase et par microscopie électronique après coloration négative à l'uranyl-acétate 2%. Les cellules sont pré-fixées dans du glutaraldéhyde 2% (15 h à 4°C) puis fixées avec le OsO₄ 2% (4°C, pendant 15 h au maximum). Les cellules sont ensuite incluses dans de l'EPPON-812 et les blocs sont très

finement coupés. Ces coupes sont contrastées avec l'uranyl-acétate, trempées dans le sel d'acétate et observées à l'aide d'un microscope électronique à transmission (Philips 400).

- 5- Le type respiratoire des bactéries est étudié par détermination de la croissance en présence ou en absence de O₂.
- 6- L'effet des variations de pH sur la croissance bactérienne est étudié en modifiant le ratio CO₂/NaHCO₃ du milieu semi-synthétique (Costilow (1981) American Society for Microbiology, Washington DC p66). Les mesures de la croissance bactérienne (DO600) sont réalisées après 24 ou 48 h d'incubation à 37°C. La recherche de la température optimale de croissance est effectuée sur milieu semi-synthétique contenant du glucose et la croissance est observée à des températures variant de 20 à 45°C. Chaque expérience est réalisée en triple. La croissance bactérienne est suivie à l'aide d'un spectrophotomètre, Spectronic 20D (Bioblock Scientific, Illkirch, France).
- On a trouvé que *Ruminococcus hydrogenotrophicus* DSM 10507 est un coccobacille à Gram positif, non sporulé et anaérobie stricte. La coloration négative révèle l'absence de flagelles. Les cellules bactériennes sont isolées ou en paire. La souche ne possède pas de catalase ni de cytochrome oxydase. La température et le pH de croissance optimale sont respectivement de 35-37°C et 6,6. Les colonies sont translucides, de couleur blanche à légèrement brune avec des bords réguliers, circulaires et de diamètre variant entre 1 et 2 mm.

Exemple 3 : Test de croissance, détermination des activités acétogènes

- L'aptitude de différentes souches bactériennes à métaboliser H₂/CO₂ et à former de l'acétate est étudiée. Les souches de *Ruminococcus hydrogenotrophicus* DSM 10507, ainsi que celles taxonomiquement proches *Ruminococcus productus* DSM 3507, *Ruminococcus productus* DSM 2950, *Ruminococcus hansenii* DSM 20583, et *Clostridium coccoides* DSM 935 (numéros DSM correspondant aux numéros des organismes déposés à la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen) sont incubées sur le milieu AC-21 modifié en présence de H₂/CO₂ (60: 40, v/v, 202 kPa) comme source d'énergie. Des cultures témoin sont incubées sous N₂/CO₂ (60: 40, v/v, 150 kPa). Trois cultures (1 témoin et 2 essais) sont effectuées pour chaque souche bactérienne. La croissance autotrophe est déterminée par incubation pendant

96 h en présence de H_2/CO_2 (60: 40, v/v, 202 kPa). La production d'acétate est mesurée par un test enzymatique (Boehringer Mannheim, Meylan, France), après 6 jours d'incubation à 37°C.

La consommation de H_2/CO_2 est mesurée

- 5 1) par détermination du volume gazeux consommé
 2) par analyse chromatographique (CPG) de la composition de la phase gazeuse.

La croissance hétérotrophe des souches acétogènes (DO_{600}) est étudiée par incubation des bactéries pendant 20 h avec du glucose (2 g/l) ou du fructose (2 g/l)
10 comme seule source d'énergie.

La fermentation du glucose est étudiée par l'incubation des cellules à 37°C pendant 20 h sur le milieu semi-synthétique contenant 2 g/l de glucose et une atmosphère composée à 100% de CO_2 . A la fin de l'incubation, les acides gras volatiles du surnageant sont dosés par chromatographie, après conversion en dérivés
15 tertiaires du butyldiméthyl (Richardson et al. (1989) Lett. Appl. Microbiol. 9 p5).

On observe que le temps de doublement de *R. hydrogenotrophicus* à 37°C sur milieu AC-21 modifié en présence de H_2/CO_2 (60: 40, v/v, 202 kPa) comme substrat est de 26,4 h. Les temps de doublement de *R. hydrogenotrophicus* à 37°C avec le glucose ou le fructose comme source d'énergie sont d'environ 2 ou 3 h.

20 On observe que la souche bactérienne étudiée est acétogène : elle présente une croissance autotrophe en présence de H_2/CO_2 et produit de l'acétate comme métabolite majeur (Tableau I). Parmi les espèces taxonomiquement proches, l'activité acétogène (i.e. consommation de H_2/CO_2 et production d'acétate) est retrouvée chez *C. coccoides* et beaucoup plus faiblement chez *R. hansenii* et *R.*
25 *productus*.

R. hydrogenotrophicus DM 10507 consomme environ 120mM de H_2 après 96 heures de culture à 37°C (1,25mM de H_2 consommé par heure). La production totale d'acétate est alors égale à 30mM (stœchiométrie : 4 H_2 consommés pour 1 acétate formé).

Tableau I : Caractéristiques fermentaires des souches cultivées en présence de H₂/CO₂ ou de glucose comme seule source d'énergie

Propriétés	<i>R.</i> <i>hydrogenotrophicus</i> DSM 10507	<i>C.</i> <i>coccoides</i> DSM 935	<i>R.</i> <i>productus</i> DSM3507	<i>R.</i> <i>productus</i> DSM 2950	<i>R.</i> <i>hansenii</i> DSM 20853
Utilisation de H₂/CO₂	++	+	-	+	+/-
PF de H₂/CO₂					
Acétate	++	+	-	+	+/-
Propionate	-	-	-	-	-
Butyrate	-	-	-	-	-
Lactate	-	-	-	-	-
Succinate	-	-	-	-	-
Ethanol	-	-	-	-	-
PF du Glucose					
Acétate	++	+	++	++	++
Propionate	-	-	-	-	-
Butyrate	-	-	-	-	-
Lactate	+	-	-	-	+
Succinate	-	++	-	-	+
Ethanol	+	-	+	+	-

Symboles : PF, produits de fermentation ; ++, métabolite majoritaire ; +, métabolite non majoritaire ; +/-, métabolite produit en faible quantité ; -, métabolite non produit.

5

Exemple 4 : Estimation de la capacité acétogène hydrogénotrophe de *R. hydrogenotrophicus* par mesure de l'incorporation de ¹³CO₂ dans l'acétate (méthode RMN)

10

L'incorporation de ¹³CO₂ dans l'acétate est mesurée par RMN, à partir de suspensions cellulaires de *R. hydrogenotrophicus* incubées en présence de H₂. Les

bactéries sont cultivées en fiole de 1 l contenant 250 ml de milieu AC21 tel que décrit dans l'exemple 1 et H_2/CO_2 comme seule source d'énergie. Après croissance à 37°C, les cellules bactériennes sont récupérées par centrifugation (12 000g pendant 20 minutes) et resuspendues dans un tampon phosphate contenant 20 mM de $NaH^{13}CO_3$ (Leclerc et al (1997), Anaerobe, 3, p307). Les suspensions sont incubées pendant 20 heures à 37°C, sous une atmosphère composée de 100% de N_2 (témoin) ou de H_2/N_2 (80/20, V/V), à 101 atm. En fin d'incubation, les suspensions sont à nouveau centrifugées à 12 000g pendant 20 minutes et les surnageants sont récupérés. La production totale d'acétate est mesurée par méthode enzymatique (kit Boehringer-Mannheim). Les métabolites marqués au ^{13}C sont analysés par RMN (Bernalier et al, (1996), FEMS Microbiol. Ecol., 19, p193).

Lorsque la bactérie est incubée en présence de H_2 , le seul métabolite détecté par RMN du ^{13}C est l'acétate. Le ^{13}C -acétate est marqué de façon équivalente sur ses groupements méthyle et carboxyle. L'acétate doublement marqué représente 72% de l'acétate marqué total. Ceci confirme que la synthèse d'acétate à partir de H_2 et CO_2 par *R. hydrogenotrophicus* s'effectue selon la voie réductrice de l'acétogénèse.

Exemple 5 : Détermination des capacités nutritionnelles des bactéries acétogènes

Le métabolisme d'autres substrats organiques par les bactéries acétogènes est évalué en utilisant un milieu AC-21 modifié contenant 5 ou 10 mM de substrat, dans une atmosphère composée de CO_2 à 100%. Le test est considéré comme positif quand la bactérie maintient sa croissance après trois transferts successifs sur un milieu contenant le même substrat, et si la DO_{600} de la culture est au moins égale au double de celle observée avec un milieu semi-synthétique basal (exempt de substrat organique), après 24 h d'incubation à 37°C.

On observe que de nombreux substrats organiques permettent la croissance hétérotrophes des bactéries considérées (Tableau II).

Tableau II : Croissance de *R. hydrogenotrophicus* et des espèces taxonomiquement proches en présence de divers substrats organiques

Substrat	<i>R.</i> <i>hydrogenotrophicus</i> DSM 10507	<i>C.</i> <i>coccoides</i> DSM 935	<i>R.</i> <i>productus</i> DSM3507	<i>R.</i> <i>productus</i> DSM 2950	<i>R.</i> <i>. hansenii</i> DSM 20853
Amidon	-	-	+	+	-
Amygdaline	-	+	+	+	+/-
Arabinose	-	+	+	+	-
Cellobiose	+	+	+	+	-
Fructose	+	+	+	+	-
Galactose	+	+	+	+	+
Inuline	-	-	-	-	+
Lactose	+	+	+	+	+
Maltose	+/-	+	+	+	+
Mannitol	-	+	+	+	-
Mannose	+	+	+	+	-
Melibiose	+/-	+	+	+	+
Raffinose	+	+	+	+	+
Rhamnose	-	+	-	-	-
Salicine	+	+	+	+	-
Sorbitol	-	+	+	+	-
Saccharose	-	+	+	+	-
Trehalose	+	+	+	+	+
Xylose	-	+	+	+	-

Symboles : -, pas de croissance visible ; +/-, faible croissance ; +, bonne croissance.

- 5 Par ailleurs, la croissance de différentes souches acétogènes hydrogénotrophes isolées de selles humaines, en présence de divers composés aromatiques comme le vanillate, le caféate ou le syringate, est estimée par mesure de la densité optique à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Spectronic 20D (l'effet de l'addition de H₂ dans la phase gazeuse de ces cultures est également
- 10 étudié). La quantité de substrat dégradé est déterminée par HPLC ainsi que la nature des métabolites formés.

La capacité à métaboliser les différents substrats aromatiques testés dépend de la souche acétogène hydrogénotrophe considérée. Les espèces de *Clostridium* sont capables de croître et de dégrader 20% à 30% du cafféate et du syringate, cette dégradation atteignant 100% lorsque H₂ est additionné à la culture. Une des
5 souches de *Clostridium* ne dégrade le vanillate qu'en présence de H₂ dans la phase gazeuse. Cette souche déméthyle le vanillate en protocatéchuate lors d'une première étape, puis, grâce à H₂, décarboxyle ce composé en catéchol. La souche de *R. hydrogenotrophicus* ne présente qu'une faible activité à l'égard du vanillate, ce métabolisme n'apparaissant pas influencé par la présence de H₂.

10

Exemple 6 : Caractère mixotrophe de la souche acétogène hydrogénotrophe, *Ruminococcus hydrogenotrophicus*.

Afin de déterminer si *R. hydrogenotrophicus* est capable de croître par mixotrophie (utilisation simultanée d'un substrat organique et d'un substrat
15 inorganique), la souche est cultivée en présence de deux sources d'énergie, l'une organique, le glucose, et l'autre inorganique, H₂/CO₂. Le milieu de culture (milieu AC21 modifié comme décrit dans l'exemple 1) contient 1,4 mM de glucose et la phase gazeuse est remplacée, après ensemencement, par un mélange de H₂/CO₂ (60/40 à 156 kPa). Les cultures sont inoculées avec 0,3 ml d'une préculture de *R.*
20 *hydrogenotrophicus* obtenue soit avec le glucose soit avec H₂/CO₂ comme seule source d'énergie. Au cours de l'incubation à 37°C, la consommation de gaz par la souche est suivie à l'aide de capteurs de pression fixés aux bouchons des cultures (Leclerc et al. (1997), Anaerobe 3 p307). La croissance bactérienne est estimée par mesure de la densité optique des cultures à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre
25 Spectronic 20D. Des prélèvements de surnageants de cultures sont effectués toutes les 2 heures afin d'estimer la consommation de glucose (dosage du glucose restant par méthode enzymatique Boehringer) et la production de métabolites fermentaires par dosage chromatographique (comme décrit dans l'exemple 3).

R. hydrogenotrophicus s'avère capable de co-utiliser les deux substrats
30 testés. Une seule phase exponentielle de croissance de la bactérie est observée en présence des deux substrats. Lors de cette phase exponentielle, une consommation simultanée du glucose et de H₂/CO₂ est observée. Ceci témoigne du caractère mixotrophe de *R. hydrogenotrophicus* à l'égard de ces 2 substrats (Leclerc et

Bernalier (2000) Arch. Microbiol., soumis pour publication). En fin de phase exponentielle, le glucose est totalement consommé par la bactérie, celle-ci maintient alors son métabolisme en phase stationnaire de croissance, par l'utilisation de H_2/CO_2 restant.

Revendications

1. Utilisation d'au moins une souche bactérienne acétogène hydrogénotrophe non pathogène pour la préparation d'une composition destinée au traitement ou à la
5 prévention des troubles gastro-intestinaux et/ou à moduler l'équilibre microbien de l'écosystème digestif chez un mammifère.
2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que les troubles gastro-intestinaux sont compris dans le groupe comprenant a) des colopathies fonctionnelles, caractérisées par les flatulences excessives, le météorisme, les
10 ballonnements, ou les douleurs abdominales, le syndrome de l'intestin irritable, et b) les colites ulcéreuses, les maladies inflammatoires intestinales, la maladie de Crohn.
3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que la au moins une souche bactérienne acétogène hydrogénotrophe non pathogène est une souche
15 autologue dudit mammifère.
4. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que la au moins une souche bactérienne acétogène hydrogénotrophe non pathogène est viable dans le tractus digestif.
5. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce
20 que la au moins une souche bactérienne acétogène hydrogénotrophe non pathogène appartient au genre *Ruminococcus*, *Clostridium*, ou *Streptococcus*.
6. Utilisation selon la revendication 5, caractérisée en ce que la au moins une souche bactérienne acétogène hydrogénotrophe non pathogène appartient à l'espèce *Ruminococcus hydrogenotrophicus*.
- 25 7. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que le mammifère est l'homme.
8. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que la au moins une souche bactérienne acétogène hydrogénotrophe non pathogène est administrée sous une forme lui permettant d'être active dans le
30 côlon.
9. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en ce ladite composition contenant la au moins une souche bactérienne acétogène hydrogénotrophe non pathogène est administrée par voie orale ou rectale.

10. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que la au moins une souche bactérienne acétogène hydrogénotrophe non pathogène est conditionnée dans un environnement anaérobie.
- 5 11. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que la composition comprend au moins un additif favorisant l'activité de la au moins une souche dans l'environnement digestif.
12. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisée en ce que la composition comprend en outre au moins un autre agent actif contre au moins une des pathologies visées.
- 10 13. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisée en ce que la composition comprend en outre un support pharmaceutiquement acceptable.
14. Composition pharmaceutique ou alimentaire, caractérisée en ce qu'elle contient au moins une souche bactérienne acétogène hydrogénotrophe non pathogène.
- 15 15. Composition selon la revendication 14, caractérisée en ce que la au moins une souche bactérienne acétogène hydrogénotrophe non pathogène appartient au genre *Ruminococcus*, *Clostridium* ou *Streptococcus*.
16. Composition selon la revendication 15, caractérisée en ce que la au moins une souche bactérienne acétogène hydrogénotrophe non pathogène appartient à
20 l'espèce *Ruminococcus hydrogenotrophicus*.
17. Composition selon l'une quelconque des revendications 14 à 16, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un additif favorisant l'activité de la au moins une souche dans l'environnement digestif.
- 25 18. Procédé de suivi spécifique d'une souche bactérienne acétogène hydrogénotrophe non pathogène utilisée selon la revendication 1 dans le tractus digestif d'un mammifère, comprenant les étapes suivantes :
 - a. on définit une séquence nucléotidique spécifique (sonde) de la souche acétogène hydrogénotrophe non pathogène que l'on désire détecter ;
 - 30 b. on effectue la détection et/ou quantification de ladite souche par hybridation de la sonde avec l'acide nucléique total extrait de la flore fécale ou avec les bactéries fécales fixées sur une lame.

19. Procédé de production d'une souche bactérienne acétogène hydrogénotrophe non pathogène pour une utilisation selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

5

a. on effectue la croissance de la souche sur un milieu adapté, en condition d'anaérobiose stricte, en présence d'un substrat carboné et/ou de H_2/CO_2 comme source d'énergie ;

b. on récupère les cellules bactériennes ;

c. on conditionne les cellules bactériennes suivant la forme galénique choisie.

10

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	BERNALIER A ET AL: "Ruminococcus hydrogenotrophicus sp. nov., a new H-2/CO-2-utilizing acetogenic bacterium isolated from human feces." ARCHIVES OF MICROBIOLOGY, vol. 166, no. 3, 1996, pages 176-183, XP000979148	18,19	A61K35/74 A61P1/00 C12Q1/68
A	* le document en entier *		
X	KELLER G H & MANAK M M: "DNA Probes" 1994, STOCKTON PRESS, NEW YORK XP002158943 208660 * page 594 - page 596 * * Procedure 15.2 *	18	
A,D	BERNALIER A ET AL: "Acetogenesis from H-2 and CO-2 by methane- and non-methane-producing human colonic bacterial communities." FEMS MICROBIOLOGY ECOLOGY, vol. 19, no. 3, 1996, pages 193-202, XP000979130		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
A	DURAND M & BERNALIER A: "Reductive acetogenesis in animal and human gut." PHYSIOLOGICAL AND CLINICAL ASPECTS OF SHORT-CHAIN FATTY ACIDS., 1995, pages 107-117, XP000979817 Cambridge University Press ISBN: 0-521-44048-3		A61K C12Q
A	VAN NEVEL C J & DEMEYER D I: "Control of rumen methanogenesis." ENVIRONMENTAL MONITORING AND ASSESSMENT, vol. 42, 1996, pages 73-97, XP000979267		
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
30 janvier 2001		Teyssier, B	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			