

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

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
4 novembre 2004 (04.11.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/093899 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
A61K 38/16, 35/74

Catherine [FR/FR]; 28, route nationale, F-62450 Le Sars
(FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2004/000875

(74) Mandataires : **GOULARD, Sophie** etc.; CABINET
ORES, 36, rue de St Pétersbourg, F-75008 Paris (FR).

(22) Date de dépôt international : 8 avril 2004 (08.04.2004)

(81) États désignés (*sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible*) : AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO,
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,
KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG,
MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH,
PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0304745 16 avril 2003 (16.04.2003) FR

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) : **COM-
PAGNIE GERVAIS DANONE** [FR/FR]; 130, rue Jules
Guesde, F-92302 Levallois Perret (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : **PETAY,
Valérie** [FR/FR]; 156 rue Georges Bizet, F-59850 Nieppe
(FR). **LECROIX, Francis** [FR/FR]; 244, rue Henri
Baillieu, F-59270 Godewaersvelde (FR). **PERRIN, Em-
manuel** [FR/FR]; 419 r Poperinghe, F-59299 Boescheppe
(FR). **GONTIER, Charles** [FR/FR]; 33 rue de la Louvière,
F-59800 Lille (FR). **BLAREAU, Jean-Pierre** [FR/FR];
65, rue de Cassel, F-59114 Steenvoorde (FR). **ROMOND,
Marie-Bénédicte** [FR/FR]; 13-14, résidence les Andelys,
Parc St Maur, F-59800 Lille (FR). **SINGER, Elisabeth**
[FR/FR]; 7 ter, Boulevard Louis XIV, F-59800 Lille (FR).
ODOU, Marie-Françoise [FR/FR]; 65, rue Henri Baillieu,
F-59270 Godeswaersvelde (FR). **DEMAILLY-MULLIE,**

(84) États désignés (*sauf indication contraire, pour tout titre de
protection régionale disponible*) : ARIPO (BW, GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasi-
en (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT,
BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR,
HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont re-
çues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: IMMUNOMODULATORY PRODUCT OBTAINED FROM A BIFIDOBACTERIUM CULTURE AND COMPOSI-
TIONS CONTAINING THE SAME

(54) Titre : PRODUIT IMMUNOMODULATEUR OBTENU A PARTIR D'UNE CULTURE DE BIFIDOBACTERIUM ET COM-
POSITIONS LE CONTENANT

(57) Abstract: The invention relates to an immunomodulatory product obtained from a *Bifidobacterium* culture, to the use thereof,
especially as a medicament or a food ingredient, and to pharmaceutical or food compositions containing the same.

(57) Abrégé : La présente invention est relative à un produit immunomodulateur obtenu à partir d'une culture de *Bifidobacterium*,
à son utilisation, notamment à titre de médicament ou d'ingrédient alimentaire, ainsi qu'aux compositions pharmaceutiques ou ali-
mentaires le contenant.



WO 2004/093899 A1

PRODUIT IMMUNOMODULATEUR OBTENU À PARTIR D'UNE CULTURE DE BIFIDOBACTERIUM ET COMPOSITIONS LE CONTENANT

La présente Invention est relative à un produit immunomodulateur obtenu à partir d'une culture de *Bifidobacterium*, à son utilisation, notamment à titre
5 de médicament ou d'ingrédient alimentaire, ainsi qu'aux compositions pharmaceutiques ou alimentaires le contenant.

Le genre *Bifidobacterium* fait partie de la famille des *Actinomycetaceae* ; il regroupe des bacilles à Gram positif, anaérobies stricts, fermentant le glucose par la voie de la fructose 6-phosphate phosphocétolase. Leur pH
10 optimal de croissance est compris entre 6 et 7, et leur température optimale de croissance est comprise entre 37 et 46°C.

Les bifidobactéries font partie de la flore intestinale humaine normale, et on leur reconnaît de nombreux effets bénéfiques pour la santé. Il est notamment connu que les nourrissons alimentés au sein, qui possèdent une flore
15 intestinale dans laquelle les bifidobactéries prédominent, résistent mieux aux infections et présentent notamment un risque de diarrhée plus faible que les nourrissons nourris avec des préparations lactées industrielles classiques.

Le rôle des bifidobactéries dans cette résistance accrue aux infections n'a pas été complètement élucidé. Différentes études indiquent qu'elles
20 possèdent un pouvoir immunomodulateur qui impliquerait des substances polysaccharidiques associées à la paroi bactérienne, ou secrétées par les bactéries au cours de la fermentation anaérobie. Gomez *et al.*, (FEMS Microbiol. Lett., 1988, **56**, 47-52) décrivent l'effet immunomodulateur de fractions exocellulaires riches en polysaccharides produites par *Bifidobacterium adolescentis* ; la demande de brevet FR
25 2 652 590 décrit un exopolymère immunopotenteur de nature polysaccharidique produit par une souche du continuum *Bifidobacterium infantis longum* ; Honoso *et al.* (Biosci. Biotech. Biochem., 1997, **61**, 312-316 et Bioscience Microflora, 1998, **17**, 97-104) décrivent des polysaccharides immunopotenteurs produits par différentes espèces de *Bifidobacterium*. L'action immunomodulatrice des bifidobactéries se
30 manifeste également par la régulation de la microflore intestinale, en particulier au détriment du développement d'espèces bactériennes pathogène. Romond *et al.* (Anaerobe, 1997, **3**, 137-143 et J. Dairy Sci., 1998, **81**, 1229-1235) décrivent ainsi des

fractions riches en glycoprotéines, produites par *Bifidobacterium breve* en conditions de fermentation anaérobie, et induisent *in vivo* un effet régulateur de la microflore intestinale.

On trouve ainsi sur le marché de nombreux produits fermentés par des bifidobactéries, éventuellement associées à d'autres bactéries lactiques, et dont l'ingestion permet de bénéficier des effets immunomodulateurs des bifidobactéries et de leurs produits de fermentation.

Cependant, et dans le cas particulier de l'alimentation infantile, ceux-ci présentent l'inconvénient d'être trop acides et de présenter, notamment dans le cas des produits en poudre, un aspect non-homogène après reconstitution, du fait de la coagulation des protéines du lait par l'acidité générée lors de la fermentation. Ils sont donc parfois mal acceptés par l'enfant et par la mère.

Afin de remédier à ces inconvénients, il a déjà été proposé dans la demande internationale WO 01/01785, un procédé de préparation d'un produit lacté immunostimulant par bioconversion, sans fermentation et donc sans acidification du produit final, d'un substrat laitier à l'aide de bifidobactéries, et en particulier de la souche *Bifidobacterium breve*, déposée selon le Traité de Budapest, le 31 mai 1999, sous le numéro I-2219 auprès de la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes) tenue par l'Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, à Paris.

Cependant, le procédé de préparation décrit dans cette demande internationale ne permet pas de préparer des produits alimentaires autres que des produits lactés et nécessite des conditions de mise en oeuvre contraignantes d'un point de vue industriel, notamment le maintien de conditions de culture aérobies, le maintien du milieu de culture à une pression osmotique correspondant à 0,93 à 0,97 d'activité de l'eau (AW), et/ou le maintien du milieu de culture à une température comprise entre 40 et 48°C.

Par ailleurs, *Clostridium perfringens* est une bactérie anaérobie, Gram-positif, sporulée qui est très répandue dans l'environnement (sol, eau, air, poussières) mais est aussi commensale de l'Homme et des animaux (flore de l'intestin, du vagin, des voies aériennes supérieures...). Les bactéries *Clostridium perfringens* sont responsables de la libération de toxines et d'enzymes dans le tractus digestif qui provoquent l'endommagement de tissus. La production de ces différentes

toxines est associée à la sporulation. Les spores persistent dans le sol, les sédiments et les surfaces exposées à la pollution fécale humaine et animale et leur présence dans l'eau est un critère de contamination fécale.

Clostridium perfringens est responsable de gangrènes gazeuses, de
5 toxi-infections alimentaires et d'entérites nécrosantes.

Bien que d'autres germes soient impliqués dans la survenue d'une myonécrose, *Clostridium perfringens* reste l'agent principal de la gangrène gazeuse. Elle est généralement post-traumatique (consécutive à des accidents) mais peut aussi être post-opératoire (surtout en chirurgie septique viscérale), purement médicale
10 (consécutive à une injection musculaire) ou encore spontanée (sur cancer colique). La gangrène gazeuse est mortelle dans 25 à 60 % des cas.

Clostridium perfringens est impliquée dans 10 à 15 % des toxi-infections alimentaires. La contamination se fait par ingestion d'aliments tels que la viande, le lait, les fruits et les légumes qui sont fréquemment contaminés par cette
15 bactérie. Une fois ingérés, si les conditions sont appropriées, l'organisme produit des toxines dans le tractus gastro-intestinal et provoquent les symptômes qui sont caractérisés, pour la forme commune d'infection, par d'intenses crampes intestinales, des douleurs abdominales aiguës, des diarrhées, des nausées, des vomissements et de la fièvre.

Clostridium perfringens est également responsable d'une affection digestive sévère appelée entérite nécrosante surtout chez le jeune enfant ou le nouveau-né. En absence de traitement approprié, elle est suivie d'une péritonite ou d'un état de choc qui est souvent fatal, la mort provenant de l'infection et de la
20 nécrose de l'intestin et de la septicémie qui en résulte.

Il peut donc être intéressant de pouvoir disposer d'un produit immunomodulateur permettant de contrôler la prolifération de *Clostridium perfringens*.
25

C'est donc afin de remédier à l'ensemble des inconvénients que présentent les produits décrits dans l'art antérieur et de pourvoir à un produit
30 immunomodulateur pouvant être incorporé dans tout type de produit alimentaire ou être utilisé pour la préparation de compositions pharmaceutiques

immunomodulatrices, que les Inventeurs ont mis au point ce qui fait l'objet de l'Invention.

Les Inventeurs se sont également donné pour but de pourvoir à une composition alimentaire ou pharmaceutique ayant un effet régulateur de la microflore intestinale, en particulier au détriment du développement d'espèces bactériennes pathogènes, notamment *Clostridium perfringens*.

La présente Invention a donc pour premier objet un produit immunomodulateur caractérisé par le fait qu'il est obtenu selon un procédé de préparation comprenant les étapes suivantes :

- 10 - l'ensemencement et l'incubation, en conditions aérobies ou anaérobies, préférentiellement anaérobies, et à une température comprise entre 30 et 40°C environ, de *Bifidobacterium* comprenant au moins la souche *Bifidobacterium breve* I-2219 dans un substrat aqueux présentant un pH compris entre 6 et 8 environ, et comprenant au moins les ingrédients suivants :
 - 15 i) du perméat de lactosérum,
 - ii) un hydrolysate de protéines de lactosérum,
 - iii) du lactose,
- l'élimination des *Bifidobacterium* du substrat aqueux ;
- l'ultrafiltration du substrat aqueux sur des membranes de filtration
20 ayant un seuil de coupure compris entre 100 et 300 kDa pour obtenir un rétentat concentré ;
 - la déshydratation du rétentat concentré, de préférence par lyophilisation ;
 - la mise en solution du rétentat déshydraté dans un tampon ;
 - 25 - la chromatographie d'exclusion sur gel sur colonne présentant un seuil d'exclusion de 600 kDa de la solution du rétentat ;
 - la récupération de la fraction filtrée à l'issue de la chromatographie qui constitue le produit immunomodulateur.

La fraction filtrée obtenue en mettant en œuvre le procédé conforme
30 à l'Invention présente des propriétés immunomodulatrices ; elle permet en particulier de stimuler la prolifération des *Bifidobacterium* et de diminuer la population en *Clostridium perfringens* au sein de la flore intestinale.

Selon l'Invention, le perméat de lactosérum entrant dans la composition du substrat aqueux peut se présenter sous la forme d'une poudre, obtenue par ultrafiltration de lactosérum, après séchage (par spray ou par toute autre technique de séchage), de la fraction liquide, déminéralisée ou non, qui franchit la membrane
5 lors de l'ultrafiltration du lactosérum.

Les hydrolysats de protéines de lactosérum utilisables dans le cadre de la présente Invention, peuvent être obtenus par les méthodes habituellement utilisées pour la préparation des hydrolysats de protéines, notamment par hydrolyse enzymatique des protéines de lactosérum à l'aide de protéases telles que la trypsine, la
10 chymotrypsine, etc... De nombreux concentrés ou isolats de protéines sériques de même que des hydrolysats de protéines de lactosérum, convenant pour la mise en œuvre de l'Invention sont connus en eux-mêmes et disponibles dans le commerce.

Avant son utilisation, le substrat aqueux est de préférence filtré sur membranes, telles que par exemple sur des membranes en polyéthersulfone, ayant un
15 seuil de coupure compris entre 100 et 300 kDa, puis le perméat autoclavé à une température d'environ 120°C pendant environ 30 minutes de façon à éviter toute contamination bactérienne indésirable du milieu culture.

Avant emploi, le pH du substrat aqueux peut être ajusté à la valeur désirée à l'aide de tout agent alcalinisant classiquement utilisé par l'homme du métier
20 tel que par exemple la soude ou la potasse.

Les *Bifidobacterium* sont, de préférence,ensemencés dans le substrat aqueux à raison de 1.10^4 à 4.10^9 unités formant colonies (UFC) par ml de substrat. Cet ensemencement peut s'effectuer par exemple par addition au substrat aqueux, dans des proportions adaptées, d'un concentré congelé de Bifidobacterium, ou
25 d'une pré culture sur milieu permettant la croissance de bifidobactéries.

Selon une forme de réalisation préférée de l'Invention, le pH du substrat aqueux est maintenu à une valeur comprise entre 6 et 8 environ pendant toute la période d'incubation, et encore plus préférentiellement entre 6,5 et 7,5. Le maintien du pH est de préférence réalisé par une neutralisation en continu du substrat aqueux à
30 l'aide d'un agent alcalinisant tel que décrit précédemment ou par une solution d'ammoniaque diluée (de préférence au demi).

Selon une forme de réalisation préférée de l'Invention, la température du substrat est maintenue à une valeur comprise entre 37 et 40°C environ pendant toute la durée de l'incubation, celle-ci étant généralement comprise entre 10 et 20 heures.

5 Selon une forme de réalisation préférée du procédé conforme à l'Invention, les ingrédients du substrat aqueux sont présents dans les quantités suivantes :

i) perméat de lactosérum : de 3 à 80 g environ et encore plus préférentiellement de 40 à 60 g environ,

10 ii) hydrolysate de protéines de lactosérum : de 2 à 80 g environ et encore plus préférentiellement de 5 à 15 g environ,

iii) lactose : de 5 à 50 g environ et encore plus préférentiellement de 10 à 30 g environ,

ces quantités étant données par litre dudit substrat aqueux.

15 Selon une forme de réalisation particulière de l'Invention, le substrat aqueux peut comprendre en outre au moins un ingrédient additionnel choisi parmi les extraits de levure, les sels tampon et le chlorhydrate de cystéine.

Lorsque le substrat aqueux comprend un sel tampon, celui-ci est préférentiellement choisi parmi le dihydrogénophosphate de sodium et le dihydrogénophosphate de potassium et représente alors de préférence de 0,5 à 5 g
20 environ et encore plus préférentiellement de 1,5 à 3 g environ par litre de substrat aqueux.

Lorsque le substrat aqueux comprend un extrait de levure, celui-ci représente alors de préférence de 0,5 à 5 g environ, et encore plus préférentiellement
25 de 1,5 à 3 g environ par litre de substrat aqueux.

Lorsque le substrat aqueux comprend du chlorhydrate de cystéine, celui-ci représente alors de préférence de 100 à 500 mg environ et encore plus préférentiellement de 200 à 400 mg environ par litre de substrat aqueux.

A la fin de la période d'incubation, l'élimination des
30 *Bifidobacterium* du milieu de culture peut être réalisée par exemple par microfiltration, ou par centrifugation du substrat aqueux. Selon une forme de réalisation préférée de l'Invention, l'élimination des *Bifidobacterium* du milieu de

culture est réalisée par centrifugation du substrat aqueux, par exemple à une vitesse de 3000 g pendant une durée d'environ 1 heure.

Selon une forme de réalisation préférée de l'Invention, le procédé comporte en outre, après l'étape d'élimination des *Bifidobacterium*, une étape supplémentaire de destruction des activités enzymatiques résiduelles contenues dans le substrat aqueux après incubation, par exemple par un traitement thermique de celui-ci à une température d'environ 75°C pendant environ 3 minutes.

L'étape d'ultrafiltration du substrat aqueux est de préférence réalisée sur des membranes en polyéthersulfone, à une température inférieure à 60°C environ.

A la fin de l'étape d'ultrafiltration, le rétentat concentré ainsi obtenu est de préférence lavé plusieurs fois, par exemple à l'eau permutée avant d'être finalement reconcentré avant d'être déshydraté par exemple par lyophilisation.

Le tampon utilisé pour la mise en solution du rétentat déshydraté est de préférence choisi parmi les tampons présentant un pH compris entre 6 et 8 tels que par exemple le tampon Tris ajusté au pH voulu par ajout d'acide chlorhydrique.

La nature des gels utilisables pour réaliser la chromatographie d'exclusion n'est pas critique à partir du moment que ceux-ci présentent un seuil d'exclusion de 600 kDa. A titre de gel on peut notamment utiliser les gels composés de dextrane et d'agarose réticulé tels que le produit vendu sous la dénomination commerciale Superdex® 200 par la société Amersham Biosciences.

Les sels présents dans la fraction filtrée peuvent en outre éventuellement être éliminés par ultrafiltration sur une membrane présentant un seuil de coupure d'environ 10 kDa.

Enfin, la fraction filtrée constituant le produit immunomodulateur peut être utilisée directement ou congelée ou lyophilisée pour conservation et utilisation ultérieure.

Cette fraction filtrée est constituée d'un complexe de polysaccharides et de protéines dans lequel la fraction glucidique représente de 10 à 20 % en poids environ, la fraction protéique représentant environ de 80 à 90 % en poids par rapport au poids total dudit complexe.

Selon l'Invention, la fraction glucidique de la fraction filtrée présente la composition en monosaccharides suivante (exprimée en rapports molaires

par rapport au rhamnose) : galactose : 11 à 14 ; mannose : 2 à 5 ; glucose : 3 à 6 ; N-acétyl galactosamine : 2,5 à 4,5 ; N-acétyl glucosamine 0,5 à 1,5 ; acide neuraminique : 4,5 à 6,5 et rhamnose : 1.

L'Invention a également pour objet le produit immunomodulateur obtenu selon le procédé décrit précédemment à titre de médicament, et en particulier à titre de médicament immunomodulateur.

Un autre objet de l'Invention est une composition pharmaceutique caractérisée par le fait qu'elle renferme, à titre de principe actif, au moins un produit immunomodulateur obtenu selon le procédé décrit précédemment, et au moins un support pharmaceutiquement acceptable.

Par pharmaceutiquement acceptable on entend tout support qui tout en conservant au produit immunomodulateur obtenu selon le procédé conforme à l'Invention ses propriétés, particulièrement ses propriétés immunomodulatrices, permet de véhiculer ledit produit.

La composition pharmaceutique selon l'Invention peut se présenter sous toute forme galénique souhaitée pour une administration par voie orale à l'homme ou à l'animal, comme par exemple sous forme liquide pour un sirop ou une solution, un spray, ou sous forme solide comme par exemple une poudre, un comprimé, une gélule, une capsule, un spray poudre, dans leurs formes diverses, libération immédiate ou programmée, une gomme, une pâte, des granulés, ou sous toute autre forme adaptée à l'administration par voie orale.

Le produit immunomodulateur obtenu selon le procédé conforme à l'Invention peut également être incorporé, à titre d'ingrédient, dans des compositions alimentaires.

Par conséquent, l'Invention a également pour objet une composition alimentaire caractérisée par le fait qu'elle renferme, à titre d'ingrédient, au moins un produit immunomodulateur obtenu selon le procédé conforme à l'Invention.

De telles compositions alimentaires peuvent être destinées à l'alimentation humaine ou animale et peuvent notamment se présenter sous forme d'une préparation lactée ou non, fermentée ou non, d'origine animale ou végétale, y compris notamment les formules infantiles ou pour adultes et seniors, et en particulier sous forme d'une préparation lactée infantile, de lait liquide ou en poudre, de produits

frais, de céréales, de biscuits (fourrage), de petits pots, de desserts, etc ou bien encore sous forme de produits alimentaires ou diététiques pour adultes, dont les produits hospitaliers, ou de compléments nutritionnels.

La présente Invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de préparation du produit immunomodulateur conforme à l'Invention, ainsi qu'aux figures annexées dans lesquelles :

- la figure 1 représente le chromatogramme obtenu après injection sur une colonne garnie d'un gel de Superdex® 200 d'un milieu de culture fermenté pendant 15 heures par la souche *Bifidobacterium breve* CNCM I-2219 (absorbance en millivolts en fonction du temps écoulé en minutes) ;
- la figure 2 compare les chromatogrammes obtenus après injection sur une colonne garnie d'un gel de Superdex® 200 d'un milieu de culture fermenté par la souche *Bifidobacterium breve* CNCM I-2219 ou par la souche *B. breve* CFPL (Collection de la Faculté de Pharmacie de Lille) C7 (absorbance en millivolts en fonction du temps écoulé en minutes) ;
- la figure 3 représente un agrandissement de la figure 2.

EXEMPLE 1 : PREPARATION D'UN PRODUIT IMMUNOMODULATEUR OBTENU PAR CULTURE DE BIFIDOBACTERIUM

On prépare un milieu de culture contenant les ingrédients suivants :

- 50 g/l de perméat de lactosérum,
- 10 g/l d'hydrolysate de protéines de lactosérum,
- 20 g/l de lactose,
- 2 g/l d'extrait de levure,
- 2.5 g/l de dihydrogénophosphate de potassium,
- 0,3 g/l de chlorhydrate de cystéine.

Le milieu de culture est ultrafiltré sur cassettes Centramate® vendues par la société PALL, munies de membranes en polyéthersulfone ayant un seuil de coupure de 200 kDa et le perméat est autoclavé pendant 30 minutes à 120°C.

Le pH du milieu de culture est alors ajusté à une valeur de 6,5 à l'aide d'une solution d'ammoniaque diluée au quart.

Le milieu de culture est ensuiteensemencé avec les bifidobactéries à raison de 6 ‰ (v/v) d'un concentré congelé de la souche de *Bifidobacterium breve* CNCM I-2219 contenant 5.10^{10} UFC de bifidobactéries par ml de concentré congelé. La population initiale en bactéries est de 3.10^8 UFC de bifidobactéries par ml de milieu de culture. Les bifidobactéries sont cultivées en anaérobiose, à une température comprise entre 37 et 40°C. Pendant la culture, le pH du milieu de culture est régulé à 6,5 au moyen d'une solution d'ammoniaque diluée au quart. Le temps de culture est de 15 heures, et la population de *Bifidobacterium* en fin de culture est environ de 2.10^7 UFC par ml de milieu de culture.

En fin de culture, les bactéries sont éliminées du milieu de culture fermenté par une centrifugation de 1 heure à 3000 g. Les activités enzymatiques résiduelles contenues dans le surnageant de centrifugation sont détruites par un traitement thermique de 3 minutes à 75°C.

Le surnageant est ultrafiltré sur cassettes Centramate® vendues par la société PALL, munies de membranes en polyéthersulfone ayant un seuil de coupure de 300 kDa à une température de 40°C environ. Il est ainsi concentré 3 fois, puis lavé 3 fois à l'eau permutée. Pendant le dernier lavage, on opère une concentration de 7 fois de la partie retenue par la membrane. On obtient ainsi un concentré appelé rétentat. Le rétentat est déshydraté par lyophilisation, puis repris dans un tampon Tris-NaCl à pH 8.

1) Etude de la composition du rétentat obtenu

La composition du rétentat est étudiée par chromatographie d'exclusion.

Pour ce faire, 25 µl de rétentat sont injectés à un débit de 0,6 ml par minute sur colonne de gel Superdex® 200 vendu par la société Amersham Biosciences et présentant un seuil d'exclusion de 600 kDa, couplée à un détecteur UV à barrette de diodes (200-300 nm). L'intégration du signal est réalisée à l'aide du logiciel KromaSystem® 2000 vendu par la société Kontron Instruments. Deux fractions sont ainsi séparées : une fraction exclue du gel est éluée après 12,5 minutes à

partir de l'injection et une fraction filtrée est éluée de 16 à 32 minutes à partir de l'injection.

Les résultats obtenus sur le rétentat après 15 heures de fermentation sont reportés sur la figure 1 annexée qui représente l'absorbance (en millivolts) en fonction du temps écoulé (en minutes) depuis l'injection du rétentat sur la colonne. Ces résultats représentent un chromatogramme typique montrant la fraction exclue et la fraction filtrée du rétentat ainsi analysé.

Les figures 2 et 3 représentent les chromatogrammes obtenus après analyse d'un rétentat issu d'une culture réalisée comme décrite précédemment et d'un rétentat issu d'une culture réalisée dans les mêmes conditions mais avec une souche différente de bifidobactéries (*B. breve* CFPL C7).

La figure 2 représente l'absorbance (en millivolts) en fonction du temps écoulé (en minutes) depuis l'injection sur la colonne des rétentats correspondants aux deux cultures réalisées respectivement avec la souche *B. breve* CNCM I-2219 et avec la souche *B. breve* CFPL C7. Ces résultats montrent que, contrairement au rétentat de la culture réalisée avec la souche de *B. breve* CNCM I-2219, le chromatogramme du rétentat de la culture réalisée avec la souche de *B. breve* CFPL C7 ne présente aucun pic correspondant à la fraction exclue et à la fraction filtrée du rétentat. En revanche, la figure 3 qui représente un agrandissement de la figure 2, montrent qu'il est nécessaire d'agrandir considérablement l'échelle d'absorbance de la figure 2 pour faire apparaître la fraction exclue et la fraction filtrée du rétentat correspondant à la culture réalisée avec la souche *B. breve* CFPL C7. Ces résultats démontrent ainsi que la souche *B. breve* CFPL C7 ne présente pas le potentiel de production de principes actifs que représente la souche *B. breve* CNCM I-2219.

2) Préparation de la fraction filtrée du rétentat

Le rétentat concentré, préalablement repris dans un tampon Tris-NaCl pH 8, est soumis à une chromatographie préparative. La séparation est réalisée par chromatographie sur colonne de gel Superdex® 200 de 50 mm de diamètre et 100 cm de hauteur, alimentée à un débit de 5 ml par minute et présentant un seuil d'exclusion de 600 kDa. Les fractions sont collectées par 10 ml et leur absorbance est mesurée à 280 nanomètres.

Deux fractions sont ainsi séparées :

- une fraction exclue du gel de poids moléculaire supérieur à 600 kDa (temps de rétention de 130 à 180 minutes +/- 10 %),
- une fraction filtrée de poids moléculaire compris entre 200 et 600 kDa (temps de rétention de 187 à 370 minutes +/- 10 %).

5 Les sels sont éliminés de la fraction filtrée ou partie active par une ultrafiltration en utilisant une membrane présentant un seuil de coupure de 10 kDa.

La fraction filtrée est concentrée lors du 3^{ème} lavage de façon à revenir à son niveau de concentration dans le rétentat. Cette fraction peut ensuite être conservée sous forme congelée ou lyophilisée. La fraction exclue peut également être
10 conservée de la même manière.

EXEMPLE 2 : ANALYSE DE LA COMPOSITION GLUCIDIQUE DE LA PARTIE ACTIVE (FRACTION FILTRÉE) PRÉPARÉE À PARTIR D'UNE CULTURE DE BIFIDOBACTERIUM

La poudre lyophilisée de fraction filtrée telle que préparée ci-dessus
15 à l'exemple 1 (10 mg) est reprise par de l'hydrazine anhydre pure (200-300 microlitres). Le mélange est incubé une nuit à 110°C, séché sous flux d'azote et repris dans 1 ml d'eau. La solution est ensuite fractionnée par perméation de gel sur colonne Fractogel TSK, vendue sous la référence HW40 par la société Merck et l'élution est réalisée en eau. La présence de sucres dans les différentes fractions recueillies est
20 recherchée par la méthode à l'orcinol et par chromatographie sur couche mince. Les résultats obtenus (non représentés) montrent que la majorité des sucres est dans la fraction non retenue sur le gel (>10 kDa) et migre peu après chromatographie sur couche mince. La partie glucidique de la fraction filtrée constitue donc un polysaccharide de masse molaire supérieure à 10 kDa. La partie glucidique de la
25 fraction filtrée représente environ 12 % à 16 % en masse de celle-ci.

La composition molaire de la fraction glucidique de la partie active est déterminée par chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse à l'aide d'un mélange de 0,5 M d'acide hydrochlorique et de méthanol pendant 24 heures à 80°C.

Un échantillon de la fraction filtrée (Echantillon F1), provenant d'un
30 essai réalisé selon l'exemple 1, est analysé.

À titre de comparaison, les mêmes analyses ont été réalisées sur un échantillon où la souche *Bifidobacterium breve* CNCM I-2219 a été remplacée par la

souche *Bifidobacterium breve* CFPL C7 (Echantillon C7) cultivée dans les mêmes conditions, ainsi que sur un échantillon où la souche *Bifidobacterium breve* CNCM I-2219 a été cultivée sur un milieu lactose non conforme à l'Invention (Echantillon milieu lactose : ML) de composition suivante :

- 5 - 60 g/l de lactose,
 - 2 g/l d'extrait de levure,
 - 0,3 g/l de chlorhydrate de cystéine.

Les étapes suivantes d'extraction et de purification étant comparables en tout point à celles décrites précédemment.

- 10 Les rapports molaires en monosaccharides donnés (exprimés par rapport au rhamnose) obtenus pour la fraction filtrée de ces différents échantillons sont regroupés dans le Tableau I suivant :

TABLEAU I

	F1	C7*	ML*
Galactose	12,8	7,7	5,8
Mannose	3,7	2,3	6,3
Glucose	4,5	2,3	2,7
N-acétyl galacto-samine	3,2	4,2	0,1
N-acétyl glucosamine	0,9	0,7	0,1
Acide neuraminique	5,4	8	0,1
Rhamnose	1	1	1

- 15 * : échantillon comparatif ne faisant pas partie de l'Invention

- On peut constater que la répartition des sucres de l'échantillon F1 est différente de celles de l'échantillon C7 correspondant à la culture d'une souche de *Bifidobacterium* différente de la souche *Bifidobacterium breve* CNCM I-2219 sur un milieu conforme à l'Invention et à celle de l'échantillon ML correspondant à la souche
- 20 *Bifidobacterium breve* CNCM I-2219 cultivée sur un milieu lactose non conforme à l'Invention.

En particulier, l'échantillon F1 renferme plus de galactose et de glucose que les échantillons C7 et ML.

EXEMPLE 3 : ETUDE DE L'ACTIVITE IMMUNOMODULATRICE DE LA FRACTION FILTRÉE DU RETENTAT

1) Effet de la fraction filtrée sur la flore intestinale des souris

L'effet de la fraction filtrée (partie active), obtenue selon le procédé décrit ci-dessus à l'exemple 1, sur l'évolution de la flore intestinale des souris a été étudié.

Le test a été réalisé sur des souris mâles C3H qui sont des souris de deuxième génération d'une lignée d'animaux axéniques, auxquelles est implantée une flore intestinale humaine adulte (provenant du CDTA, Centre de Distribution, Typage & Archivage animal, CNRS, Orléans, France).

Les souris sont maintenues dans des isolateurs pour éviter toute modification de leur nouvelle flore intestinale. A leur réception, les souris sont âgées de 8 à 10 semaines. Un temps d'adaptation d'au moins 2 semaines est laissé aux souris après réception pour supprimer tout stress dû au transport et pour qu'elles s'acclimatent à leur nouvel environnement.

Pendant toute cette durée d'adaptation et jusqu'au début de l'expérience, ces souris disposent d'eau stérile comme boisson.

Pendant toute la durée de l'expérience, la nourriture utilisée comme base alimentaire est un régime standard de granulés RO3 vendus par la société UAR stérilisés par irradiation, contenant 25 % de protéines, 49,8 % de glucides, 5 % de lipides et 4 % de cellulose.

A l'âge de 12 semaines, début de l'expérience, on constitue plusieurs groupes, un groupe de souris qui recevra pendant les 15 jours d'essai la fraction filtrée des métabolites de *Bifidobacterium breve* CNCM I-2219 (partie active) à la place de l'eau des biberons, à raison de 6 ml par jour et par souris, pendant que deux autres groupes recevront respectivement la fraction exclue ou continueront de recevoir de l'eau (groupe contrôle).

Un changement quotidien des biberons est réalisé afin d'éviter toute modification de la composition des produits à tester par prolifération bactérienne. Les selles sont récoltées pour l'analyse avant le traitement (T0), puis au 7^{ème} et au 15^{ème} jour durant l'administration du produit (T7 et T15).

Chaque produit est testé sur un lot d'au moins 6 souris et on suit l'évolution des bactéries *Bifidobacterium* et *Clostridium perfringens* dans la flore intestinale des souris.

Les prélèvements de selles sont faits dans des tubes à hémolyse stériles et sont pesés aseptiquement puis dilués en solution préréduite de Ringer diluée au quart et supplémentée en chlorhydrate de cystéine (0,3 g/l), de façon à obtenir des dilutions au dixième allant de 10^{-1} à 10^{-4} . Le contenu est enfin déposé à raison de 100 µl par boîte, sur différents milieux de culture contenus dans des boîtes de Pétri :

- Milieu de Beerens (Be) (composé de 35 g/l de base gélose Columbia, 5 g/l de glucose, 0,3 g/l de chlorhydrate de cystéine, 0,5 % d'acide propionique et ajusté à pH 5) pour la recherche et le dénombrement de *Bifidobacterium*, après étalement de dilutions allant de 10^{-1} à 10^{-4} ;

- Milieu Columbia (CC) (composée de 35 g/l de base Columbia (Difco), 15 g/l d'agar ; ajusté à pH 7,3 et autoclavé 15 minutes à 120 °C) pour la recherche et le dénombrement des spores de *Clostridium*, après étalement de dilutions chauffées allant de 10^{-1} à 10^{-2} .

La recherche et la numération de *Bifidobacterium* est effectuée sur le milieu préréduit Beensemencé directement alors que les spores de *Clostridium perfringens* sont recherchées après chauffage des dilutions à 75°C pendant 10 minutes et ensemencement sur gélose CC supplémentée en glucose (5 g/l), en chlorhydrate de cystéine (0,3 g/l) et en sang de cheval (5 % v/v, vendu par la société Eurobio).

L'étalement est réalisé à l'aide de billes de verre stériles sur les milieux indiqués et la lecture des milieux est réalisée après 5-7 jours d'incubation en anaérobiose à 37°C.

L'identification des bactéries est réalisée d'une part après description des colonies obtenues sur chacun des milieux et d'autre part à l'aide d'une coloration de Gram.

Les résultats concernant l'évolution de *Bifidobacterium* et de *Clostridium perfringens* dans les selles des souris sont reportés respectivement dans les Tableaux II et III suivants :

TABLEAU II

<i>Bifidobacterium</i>			
	T0	T7	T15
Fraction exclue	4,02 ± 0,74 (8)	4,54 ± 1,0 (11)	4,56 ± 0,36 (12)*
	n = 18	n = 18	n = 12
Fraction filtrée	3,8 ± 0,5 (9)	4,3 ± 0,55 (11)	4,75 ± 1,15 (9) *
	n = 18	n = 18	n = 18

* : p<0,025 ;

5

TABLEAU III

<i>Clostridium perfringens</i>			
	T0	T7	T15
Fraction exclue	3,41 ± 0,34 (10)	3,68 ± 0,38 (7)	3,97 ± 1,58 (3)
	n = 18	n = 18	n = 12
Fraction filtrée	3,7 ± 0,4 (13)	3,5 ± 0,1 (5) **	4,0 ± 0,2 (7) **
	n = 18	n = 18	n = 18

** : p<0,05

Dans ces tableaux, les résultats obtenus sont exprimés en moyenne et écart-type du log du nombre d'UFC/g de selles, et n est le nombre de souris utilisées pour chaque produit et jours testés (comparaison de rang par test de Wilcoxon pour échantillons appariés), les astérisques indiquent les résultats significatifs par rapport au temps T0. Dans ces tableaux, le chiffre mentionné entre parenthèse correspond au nombre de souris dans lesquelles est présente la bactérie en question au dessus du seuil de détection. Les résultats correspondants au milieu non ensemencé sont similaires à la valeur obtenue à T0 et restent constants au cours du temps pendant les 15 jours de l'expérience (résultats non représentés dans les tableaux).

Ces résultats montrent que l'administration de l'une quelconque des deux fractions (exclue ou filtrée) conduit effectivement à une augmentation des *Bifidobacterium* mais que seule la fraction filtrée est efficace pour provoquer une diminution de la population en *Clostridium perfringens* au sein de la flore intestinale des souris.

2) Effet de la fraction filtrée sur l'expression des galectines 1 et 3

La mesure de l'expression des galectines-1 et -3 est effectuée sur les souris à flore humaine adulte décrites précédemment.

A l'âge de 12-14 semaines, début de l'expérience, on constitue deux groupes de souris, un groupe de souris qui recevra pendant toute la durée de l'expérience la fraction filtrée contenant les métabolites de *Bifidobacterium breve* CNCM I-2219 à la place de l'eau des biberons, à raison de 10 ml par jour et par souris pendant qu'un autre groupe de souris continuera de recevoir de l'eau (groupe contrôle).

Au 21^{ème} jour, les souris sont sacrifiées pour réaliser une étude biologique sur l'expression des galectines-1 et -3, évaluée par le dosage de l'ARNm codant pour ces galectines par RT-PCR quantitative (*Polymerase Chain Reaction*).

La modification de l'expression des galectines-1 et -3 dans les poumons constitue un indicateur de l'effet des métabolites produits par la souche de *Bifidobacterium breve* CNCM I-2219 contenus dans la fraction filtrée.

Les galectines-1 et -3 sont dosées dans les poumons de souris ayant été sacrifiées comme décrit précédemment.

Pour ce faire, une fraction de poumon (un lobe) est prélevée stérilement sur chaque souris. Le lobe ainsi prélevé est ensuite déposé dans une boîte de Pétri préalablement traitée pendant 24 heures avec une solution stérile d'eau et de DEPC (DiEthyl PyroCarbonate, vendu par la société Sigma) à 1/1000. Le lobe d'organe est alors perfusé une première fois avec du tampon PBS à l'aide d'une seringue et d'une aiguille stérile. Le lobe est ensuite transféré dans une autre boîte de Pétri contenant 200 microlitres de PBS additionné de 50 unités d'inhibiteur de RNase (vendu par la Société Applied Biosystems) et est perfusé à nouveau avec cette solution. Le lobe est enfin découpé en tranches inférieures à 5 mm qui sont déposées dans un tube Biopur® (Eppendorf) contenant 0,5 ml d'une solution de stabilisation de l'ARN, vendue sous la référence RNALater® par la société Qiagen, puis stockées au congélateur à -20°C jusqu'à l'analyse.

a) Extraction des ARN totaux des poumons

L'ARN total est extrait des tissus après lyse cellulaire selon le protocole d'utilisation du kit d'extraction RNeasy protect® vendu sous la référence 74126 par la société Qiagen.

5 Pour ce faire, la solution de stabilisation est retirée et une bille de tungstène traitée au DEPC ainsi que 600 microlitres d'une solution de lyse (tampon RLT contenu dans le kit) sont ajoutés. L'échantillon est ensuite broyé à l'aide d'un broyeur RETSCH MM2000, puis centrifugé à 13000 g pendant 3 minutes à 4°C. Le surnageant est alors placé dans un tube de 1,5 ml contenant 600 microlitres d'éthanol
10 à 70 % puis homogénéisé. Une partie de cette solution (700 microlitres) est ensuite déposée sur une colonne de filtration qui permet d'accrocher les ARN, pour être centrifugée à 8000 g pendant 1 minute à 4°C. Après avoir vidé le tube collecteur, 700 microlitres d'un tampon de lavage (tampon RW1 contenu dans le kit) sont ajoutés sur la colonne qui sera centrifugée à 8000 g pendant 1 minute à 4°C. Le tube collecteur
15 est à nouveau vidé et 500 microlitres d'un second tampon de lavage contenant de l'éthanol à 70 % (tampon RPE contenu dans le kit) est ajouté sur la colonne pour être centrifugée à 8000 g pendant 1 minute à 4°C. Cette dernière étape est renouvelée mais en effectuant une centrifugation à 13 000 g pendant 2 minutes à 4°C. Enfin, 30 microlitres d'un tampon d'élution permettant de décrocher les ARN de la colonne
20 (tampon RNase free contenu dans le kit) sont ajoutés sur la colonne. L'éluat est alors centrifugé à 8 000 g pendant 1 minute à 4°C après avoir été incubé à température ambiante pendant 5 minutes. L'étape d'élution est à nouveau effectuée et les échantillons ainsi obtenus sont congelés rapidement à -80°C.

25 Une quantité équivalente à une unité de DNase, vendue par la société Boehringer, est ajoutée à chaque échantillon qui est ensuite incubé au bain-marie à 37°C pendant 15 minutes.

Afin d'évaluer la quantité d'ARN total des échantillons, ceux-ci sont dilués au 1/8^{ème} dans de l'eau stérile qui est placée dans une microcuve permettant la lecture de l'absorbance à 260 nm sur un spectrophotomètre UV de référence
30 Genquant, vendu par la société Pharmacia. Pour obtenir la concentration en ARN total des échantillons, la valeur de la densité optique (DO) ainsi obtenue est multipliée par le facteur de dilution et par 40 (une unité de DO = 40 microgramme/ml d'ARN).

b) RT-PCR quantitative utilisant la méthodologie Taq Man®

La RT-PCR quantitative est réalisée à l'aide du kit qPCR™ Core Kit vendu par la société Eurogentec dans un thermocycleur de référence Abi Prism 7700 (*Sequence Detection System*, Applied Biosystems) vendu par la société Perkin Elmer.

- 5 Le mélange réactionnel résumé dans le tableau IV suivant est réalisé :

TABLEAU IV

Réactifs	Volume en µl/tube	Concentration finale
Tampon PCR (10 x) *	5	1 x
MgCl ₂ (50 mM) *	5	5 mM
dNTP (2,5 mM) *	6	300 µM
Amorce sens (10 pM)	1	200 µM
Amorce anti-sens (10 pM)	1	200 µM
Sonde (10 pM)	1	200 µM
Inhibiteur de RNase (40 unités)	0,5	20 unités
Polymérase Hot Gold Star (5 unités)	0,25	1,25 unités
MuLV (5 unités)	0,25	12,5 unités
ARN totaux	10	100 ng/tube
Eau pure	qsp 50 µl	

* produit fourni dans le kit qPCR™ Core Kit

- 10 Le mélange réactionnel est soumis au programme suivant : 10 minutes à 65°C pour éliminer les structures secondaires des ARN, 30 minutes à 42°C pour activer la transcriptase inverse, 10 minutes à 95°C pour activer la polymérase, 15 secondes à 95°C pour dénaturer les brins d'ADN et 1 minute à 61°C pour l'hybridation et l'élongation à partir des amorces. Quarante cycles sont effectués pour les deux dernières étapes.

- 15 L'expression des galectines-1 et -3 est évaluée par rapport à l'expression d'un gène de référence, tel que celui codant pour la β-actine dont l'expression est constante.

Les sondes et les amorces utilisées et choisies grâce au logiciel Primer Express® vendu par la société Perkin Elmer sont les suivantes :

Galectine-1 :

Sens : 5'-TCA ATC ATG GCC TGT GGT CTG-3' (SEQ ID n° 4)

Anti-sens : 5'-AAG CTC TTG GCG TCC GAG G-3' (SEQ ID n° 5)

Sonde : 5'-TCG CCA GCA ACC TGA ATC AAC CTG-3' (SEQ ID n° 6)

5 Galectine-3 :

Sens : 5'-AAT GGC AGA CAG CTT TTC G-3' (SEQ ID n° 7)

Anti-sens : 5'-GAT CAT GGC GTG GTT AGC-3' (SEQ ID n° 8)

Sonde : 5'-TTC CAC TTT AAC CCC CGC TTC AAT GAG AAC-3'
(SEQ ID n° 9)

10 β-actine :

Sens : 5'-TGG CGC TTT TGA CTC AGG ATT-3' (SEQ ID n° 10)

Anti-sens : 5'-GGG ATG TTT GCT CCA ACC AAC-3' (SEQ ID n° 11)

Sonde : 5'-GCC GTC GCC TTC ACC GTT CCA GTT TTT-3' (SEQ ID
n° 12)

15 Afin de valider chaque microplaque soumise aux cycles de PCR, un
calibreur est préparé à partir de poumons d'un lot de 6 souris C3H à flore humaine
soumises à un régime alimentaire standard (eau stérile et granules RO3) sur lesquelles
un lobe a été prélevé. Les ARN totaux ont été extraits à l'aide du protocole
précédemment décrit pour le poumon des lots de souris à tester. Les différents extraits
20 ainsi obtenus sont ensuite rassemblés pour chaque organe afin de constituer un pool
servant de calibreur pendant toute la durée de l'analyse.

Lors de l'analyse, les prélèvements à tester sont déposés en duplicate
et la gamme étalon réalisée à partir de l'échantillon calibreur est déposée en triple.
Une moyenne est alors réalisée à partir de chaque prélèvement et pour l'échantillon
25 calibreur.

Les résultats de l'expression relative de la galectine-1 et -3 par
rapport à la β-actine dans le poumon des souris sont regroupés dans le Tableau V
suivant :

TABLEAU V

	Alimentation	
	Contrôle	Fraction filtrée
		21 j
Galectine-1	n = 6 ^a	n = 6
	0,795 ^b (0,77-1,44) ^c	1,111 (0,93-1,99) U = 4 p = 0,013
Galectine-3	n = 6	n = 6
	1,695 (1,56-1,82)	1,625 (0,95-1,87)

Dans le tableau V :

- 5 - ^a = nombre de souris par lot ;
- ^b = médiane de l'expression relative de galectine ;
- ^c = résultats extrêmes d'expression relative de galectine ;
- la valeur désignée par la lettre U est la valeur statistique du test U de Mann-Whitney ;
- 10 - p indique le seuil de significativité de la méthode.

Ces résultats montrent qu'une augmentation significative de l'expression de la galectine-1 est observée dans les poumons des souris pour lesquelles l'eau de boisson a été substituée par la fraction filtrée.

15 En revanche, aucune modification de l'expression de la galectine-3 n'est observée dans les poumons des souris pour lesquelles l'eau de boisson a été substituée par la fraction filtrée.

20 L'ensemble de ces résultats démontre que la fraction filtrée (produit immunomodulateur obtenu selon le procédé conforme à l'Invention) a un effet immunomodulateur et permet d'augmenter la population de *Bifidobacterium* et de diminuer la population en *Clostridium perfringens*.

REVENDICATIONS

1. Produit immunomodulateur caractérisé par le fait qu'il est obtenu selon un procédé de préparation comprenant les étapes suivantes :

- 5 - l'ensemencement et l'incubation, en conditions aérobies ou anaérobies et à une température comprise entre 30 et 40°C environ, de *Bifidobacterium* comprenant au moins la souche *Bifidobacterium breve* I-2219 dans un substrat aqueux présentant un pH compris entre 6 et 8 environ, et comprenant au moins les ingrédients suivants :

- 10 i) du perméat de lactosérum,
 ii) un hydrolysate de protéines de lactosérum,
 iii) du lactose
 - l'élimination des *Bifidobacterium* du substrat aqueux ;
 - l'ultrafiltration du substrat aqueux sur des membranes de filtration
15 ayant un seuil de coupure compris entre 100 et 300 kDa pour obtenir un rétentat concentré ;
 - la déshydratation du rétentat concentré ;
 - la mise en solution du rétentat déshydraté dans un tampon ;
 - la chromatographie d'exclusion sur gel sur colonne présentant un
20 seuil d'exclusion de 600 kDa de la solution du rétentat ;
 - la récupération de la fraction filtrée à l'issue de la chromatographie qui constitue le produit immunomodulateur.

2. Produit immunomodulateur selon la revendication 1, caractérisé par le fait que les *Bifidobacterium* sont ensemencés dans le substrat aqueux à raison de
25 1.10^4 à 4.10^9 unités formant colonies par ml de substrat.

3. Produit immunomodulateur selon la revendication 1 ou 2, caractérisé par le fait le fait que la température du substrat est maintenue une valeur comprise entre 37 et 40°C pendant toute la durée de l'incubation.

4. Produit immunomodulateur selon l'une quelconque des
30 revendications 1 à 3, caractérisé par le fait que le pH du substrat aqueux est maintenu à une valeur comprise entre 6 et 8 pendant toute la période d'incubation.

5. Produit immunomodulateur selon la revendication 4, caractérisé par le fait que le pH du substrat aqueux est maintenu à une valeur comprise entre 6,5 et 7,5 pendant toute la période d'incubation.

6. Produit immunomodulateur selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que les ingrédients du substrat aqueux sont présents dans les quantités suivantes :

- i) perméat de lactosérum : de 3 à 80 g,
- ii) hydrolysate de protéines de lactosérum : de 2 à 80 g,
- iii) lactose : de 5 à 50 g

ces quantités étant données par litre dudit substrat aqueux.

7. Produit immunomodulateur selon la revendication 6, caractérisé par le fait que les ingrédients du substrat aqueux sont présents dans les quantités suivantes :

- i) perméat de lactosérum : de 40 à 60 g,
- ii) hydrolysate de protéines de lactosérum : de 5 à 15 g,
- iii) lactose : de 10 à 30 g

ces quantités étant données par litre dudit substrat aqueux.

8. Produit immunomodulateur selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que le substrat aqueux comprend en outre au moins un ingrédient additionnel choisi parmi les sels tampon, les extraits de levure et le chlorhydrate de cystéine.

9. Produit immunomodulateur selon la revendication 8, caractérisé par le fait que le substrat aqueux comprend un sel tampon choisi parmi le dihydrogénophosphate de sodium et le dihydrogénophosphate de potassium qui représente de 0,5 à 5 g par litre de substrat aqueux.

10. Produit immunomodulateur selon la revendication 8, caractérisé par le fait l'extrait de levure représente de 0,5 à 5 g par litre de substrat aqueux.

11. Produit immunomodulateur selon la revendication 8, caractérisé par le fait que le chlorhydrate de cystéine représente de 100 à 500 mg par litre de substrat aqueux.

12. Produit immunomodulateur selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que l'élimination des

Bifidobacterium du milieu de culture est réalisée par microfiltration ou par centrifugation du substrat aqueux.

13. Produit immunomodulateur selon la revendication 12, caractérisé par le fait que l'élimination des *Bifidobacterium* du milieu de culture est réalisée par
5 centrifugation du substrat aqueux.

14. Produit immunomodulateur selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que le procédé comporte en outre, après l'étape d'élimination des *Bifidobacterium*, une étape supplémentaire de destruction des activités enzymatiques résiduelles contenues dans le substrat aqueux
10 après incubation.

15. Produit immunomodulateur selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que la chromatographie d'exclusion est réalisée sur un gel de dextrane et d'agarose réticulé.

16. Produit immunomodulateur selon l'une quelconque des
15 revendications précédentes, caractérisé par le fait que la fraction filtrée est constituée d'un complexe de polysaccharides et de protéines dans lequel la fraction glucidique représente de 10 à 20 % en poids, la partie protéique représentant de 80 à 90 % en poids par rapport au poids total dudit complexe.

17. Produit immunomodulateur selon la revendication 16, caractérisé
20 par le fait que la fraction glucidique de la fraction filtrée présente la composition en monosaccharides suivante (exprimée en rapports molaires par rapport au rhamnose) : galactose : 11 à 14 ; mannose : 2 à 5 ; glucose : 3 à 6 ; N-acétyl galactosamine : 2,5 à 4,5 ; N-acétyl glucosamine 0,5 à 1,5 ; acide neuraminique : 4,5 à 6,5 et rhamnose : 1.

18. Produit immunomodulateur selon l'une quelconque des
25 revendications précédentes, à titre de médicament.

19. Produit immunomodulateur selon l'une quelconque des revendications précédentes, à titre de médicament immunomodulateur.

20. Composition pharmaceutique caractérisée par le fait qu'elle renferme, à titre de principe actif, au moins un produit immunomodulateur obtenu
30 selon le procédé tel que défini à l'une quelconque des revendications 1 à 17, et au moins un support pharmaceutiquement acceptable.

21. Composition pharmaceutique selon la revendication 20, caractérisée par le fait qu'elle est destinée à l'administration par voie orale et qu'elle se présente sous forme liquide ou solide.

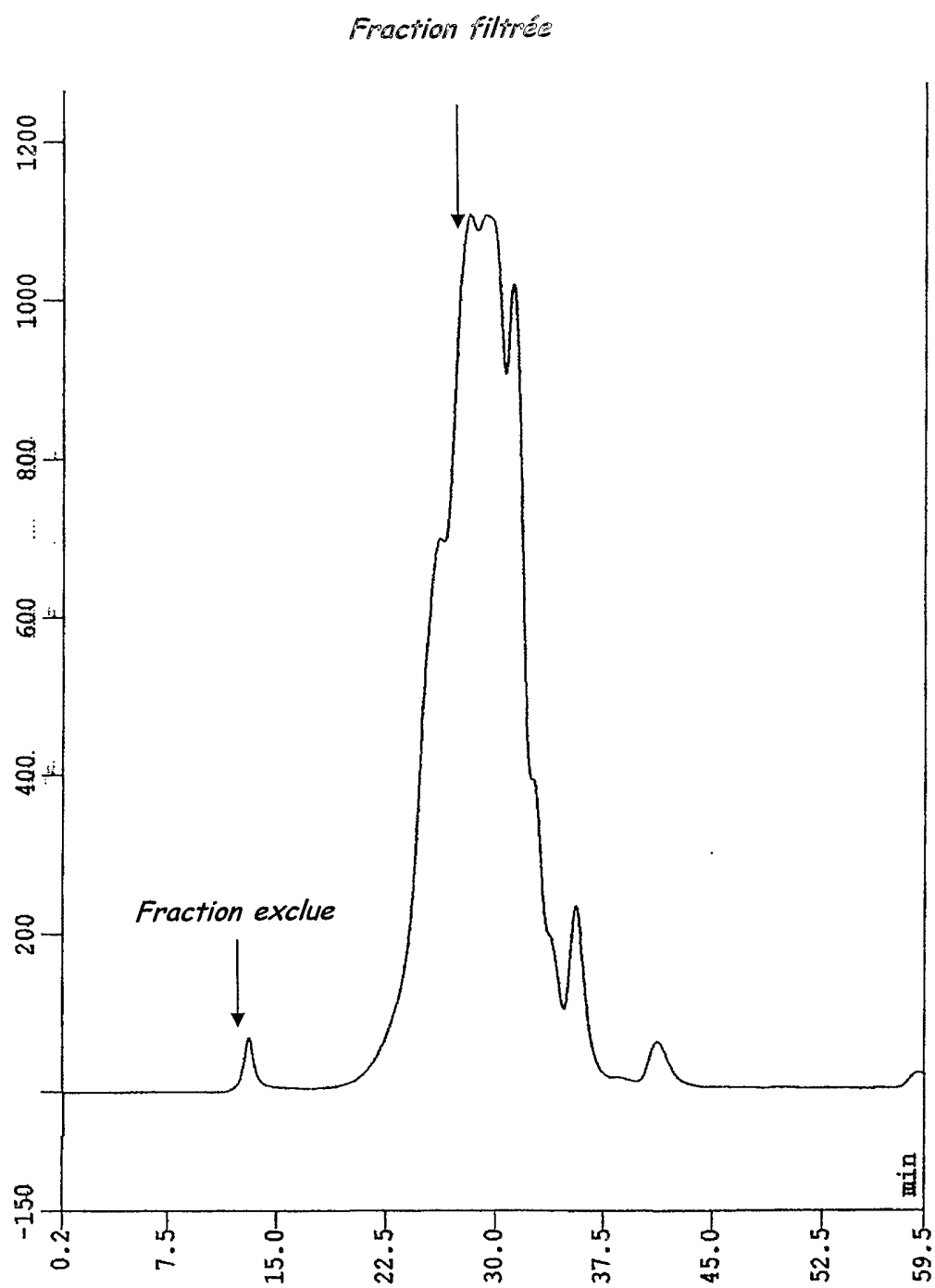
5 22. Composition alimentaire caractérisée par le fait qu'elle renferme, à titre d'ingrédient, au moins un produit immunomodulateur obtenu selon le procédé tel que défini à l'une quelconque des revendications 1 à 17.

10 23. Composition alimentaire selon la revendication 22, caractérisée par le fait qu'elle se présente sous la forme d'une préparation lactée ou non, fermentée ou non, d'origine animale ou végétale, y compris de formules infantiles, pour adultes ou pour seniors.

24. Composition alimentaire selon la revendication 23, caractérisée par le fait qu'elle se présente sous la forme de lait liquide ou en poudre, de produits frais, de céréales, de biscuits (fourrage), de petits pots, de desserts, de produits hospitaliers, de produits diététiques ou de compléments nutritionnels.

1/3

FIGURE 1



2/3

FIGURE 2

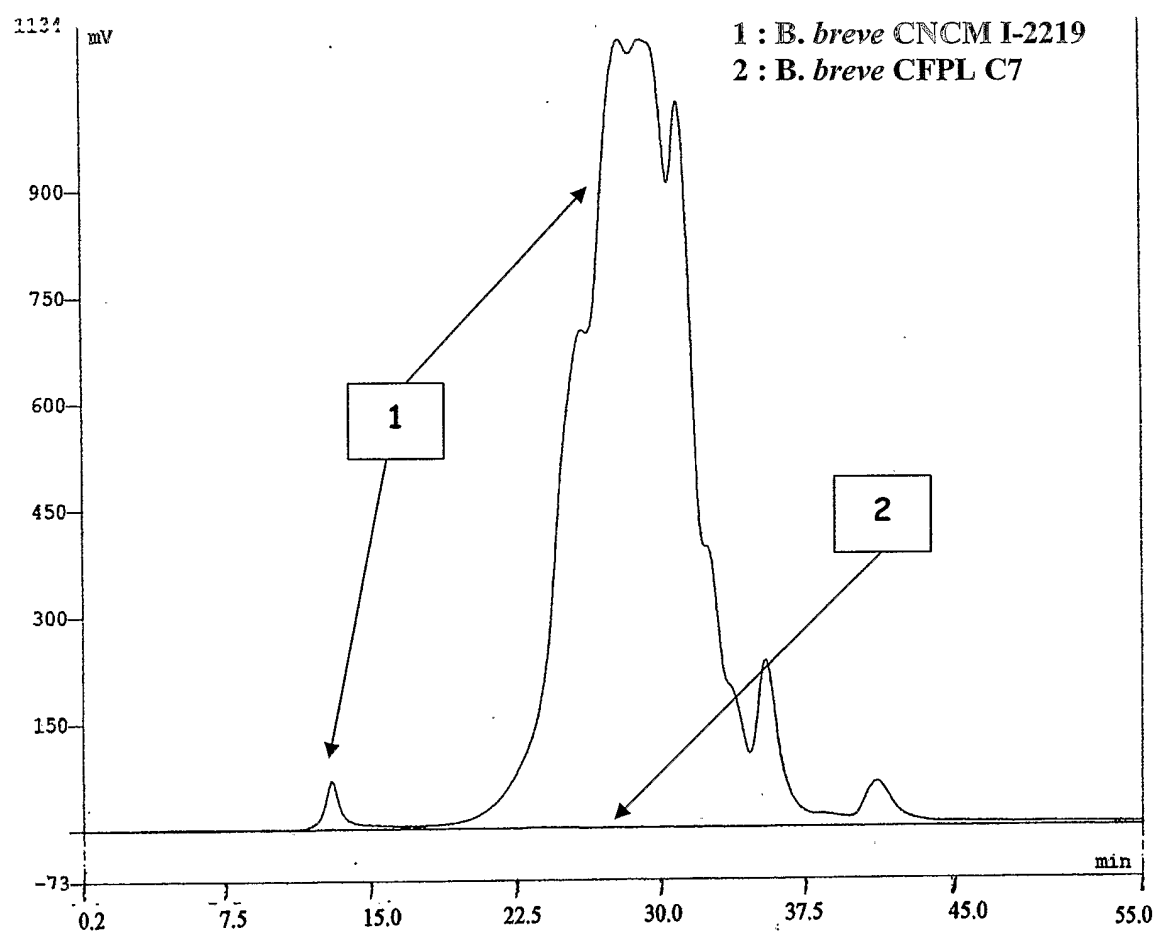
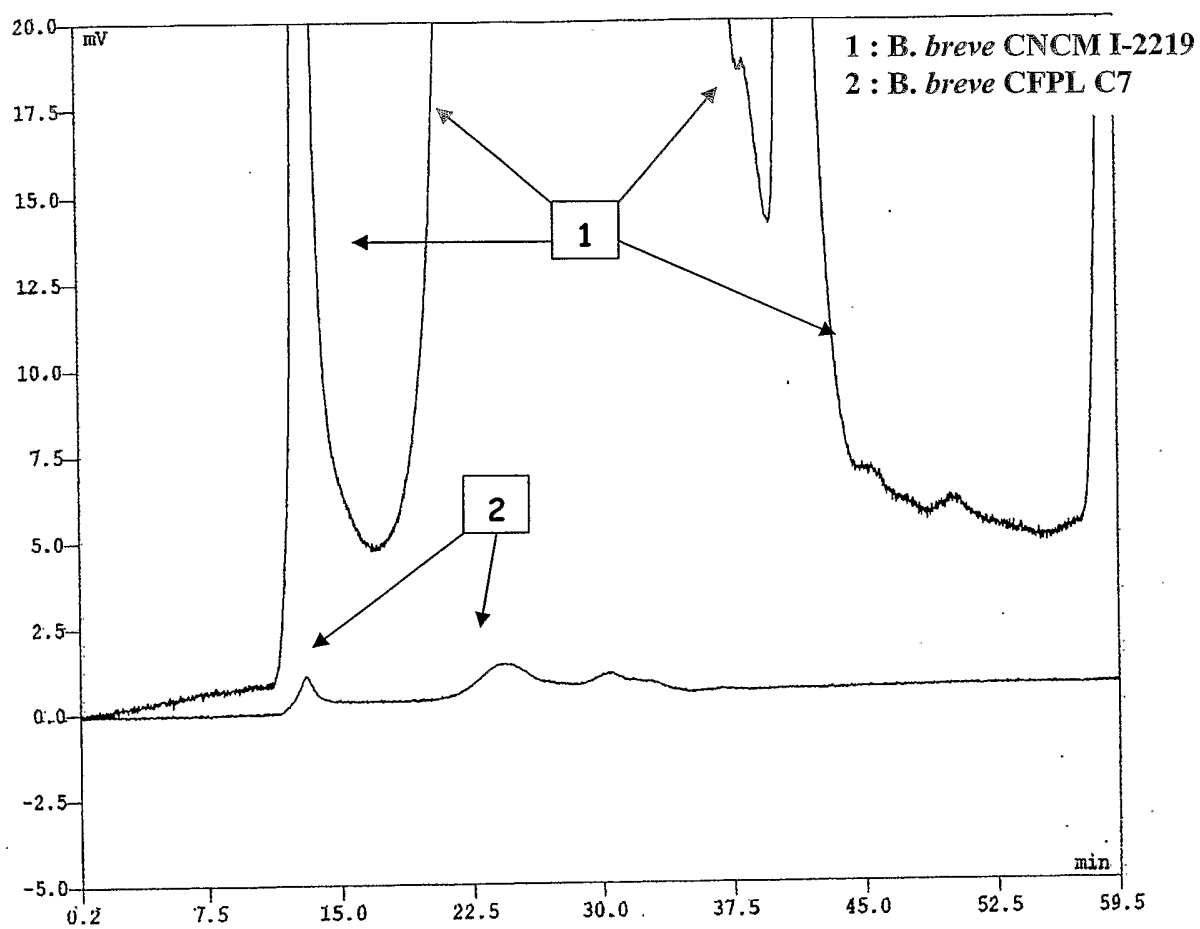


FIGURE 3



F191 ext 195 seq.ST25.txt
SEQUENCE LISTING

<110> COMPAGNIE GERVAIS-DANONE

PETAY, Valérie

LECROIX, Francis

PERRIN, Emmanuel

GONTIER, Charles

BLAREAU, Jean-Pierre

ROMOND, Marie-Bénédicte

SINGER, Elisabeth

ODOU, Marie-Françoise

DEMAILLY-MULLIE, Catherine

<120> PRODUIT IMMUNOSTIMULANT OBTENU À PARTIR D'UNE CULTURE DE BIFIDOBACTERIUM
ET COMPOSITIONS LE CONTENANT

<130> F191 EXT 195

<150> FR0304745

<151> 2003-04-16

<160> 9

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 1

tcaatcatgg cctgtggtct g

21

<210> 2

F191 ext 195 seq.ST25.txt

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 2

aagctcttgg cgtccgagg

19

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> probe

<400> 3

tcgccagcaa cctgaatcaa cctg

24

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 4

aatggcagac agcttttcg

19

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 5

F191 ext 195 seq.ST25.txt

gatcatggcg tggtttagc

18

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> probe

<400> 6

ttccacttta acccccgcgtt caatgagaac

30

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 7

tggcgctttt gactcaggat t

21

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 8

gggatgtttg ctccaaccaa c

21

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

F191 ext 195 seq.ST25.txt

<223> probe

<400> 9

gccgtcgcct tcaccgttcc agttttt

27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR2004/000875

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K38/16 A61K35/74

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K C12P

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
Y	MULLIÉ C ET AL: "Partial characterization of bifidobacterium breve C50 cell-free whey compounds inducing modifications to the intestinal microflora." JOURNAL OF DAIRY SCIENCE. JUN 2002, vol. 85, no. 6, June 2002 (2002-06), pages 1383-1389, XP002269107 ISSN: 0022-0302 page 1383, right-hand column, paragraph 1 - paragraph 4 page 1385, left-hand column, paragraph 2 page 1387, right-hand column, paragraph 2 page 1888, left-hand column, paragraph 4 ----- -/--	1-24

☒ Further documents are listed in the continuation of box C☒ Patent family members are listed in annex

* Special categories of cited documents

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 October 2004

Date of mailing of the international search report

15/10/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5816 Patentlaan 2
 NL - 2260 HV Rijswijk
 Tel (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl,
 Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bayrak, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR2004/000875

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
Y	WO 01/01785 A (BLAREAU JEAN PIERRE ; GERVAIS DANONE SA (FR); GONTIER CHARLES (FR); LE) 11 January 2001 (2001-01-11) cited in the application page 1, line 3 - page 2, line 14; claims 1-5 page 4, line 18 - line 23 -----	1-24
A	EP 0 768 375 A (NESTLE SA) 16 April 1997 (1997-04-16) page 2, line 16 - line 25; claims 1,2 page 2, line 35 - line 41 -----	1-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR2004/000875

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0101785	A	11-01-2001	FR 2795917 A1	12-01-2001
			AT 271782 T	15-08-2004
			AU 6294500 A	22-01-2001
			BR 0012154 A	12-03-2002
			CA 2389490 A1	11-01-2001
			CN 1359264 T	17-07-2002
			DE 60012524 D1	02-09-2004
			EP 1189517 A1	27-03-2002
			WO 0101785 A1	11-01-2001
			JP 2003503079 T	28-01-2003
			PL 353490 A1	17-11-2003
			ZA 200110384 A	23-07-2002
EP 0768375	A	16-04-1997	EP 0577904 A1	12-01-1994
			EP 0768375 A1	16-04-1997
			AT 172245 T	15-10-1998
			DE 69227329 D1	19-11-1998
			DE 69227329 T2	01-04-1999
			DK 768375 T3	23-06-1999
			ES 2124060 T3	16-01-1999
			AT 153063 T	15-05-1997
			AU 673525 B2	14-11-1996
			AU 4158793 A	13-01-1994
			CA 2099856 A1	07-01-1994
			CZ 9301343 A3	16-02-1994
			DE 69219768 D1	19-06-1997
			DK 577904 T3	27-10-1997
			ES 2102485 T3	01-08-1997
			FI 933002 A	07-01-1994
			GR 3024219 T3	31-10-1997
			HK 1000143 A1	24-12-1997
			HU 68567 A2	28-06-1995
			IE 930482 A1	12-01-1994
			JP 2916350 B2	05-07-1999
			JP 6315373 A	15-11-1994
			NO 932408 A	07-01-1994
			NZ 248057 A	28-08-1995
			PL 299542 A1	21-02-1994
			RO 115175 B1	30-11-1999
			RU 2126446 C1	20-02-1999
			SK 280682 B6	12-06-2000
			SK 71293 A3	06-07-1994
			US 5494664 A	27-02-1996
			US 5603930 A	18-02-1997

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR2004/000875

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 A61K38/16 A61K35/74

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)

CIB 7 A61K C12P

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, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no des revendications visées
Y	MULLIÉ C ET AL: "Partial characterization of bifidobacterium breve C50 cell-free whey compounds inducing modifications to the intestinal microflora." JOURNAL OF DAIRY SCIENCE. JUN 2002, vol. 85, no. 6, juin 2002 (2002-06), pages 1383-1389, XP002269107 ISSN: 0022-0302 page 1383, colonne de droite, alinéa 1 - alinéa 4 page 1385, colonne de gauche, alinéa 2 page 1387, colonne de droite, alinéa 2 page 1888, colonne de gauche, alinéa 4 ----- -/--	1-24

☒ 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 international ou après cette date

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

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

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

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'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

Z document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

8 octobre 2004

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

15/10/2004

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, Tx 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Bayrak, S

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR2004/000875

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	WO 01/01785 A (BLAREAU JEAN PIERRE ; GERVAIS DANONE SA (FR); GONTIER CHARLES (FR); LE) 11 janvier 2001 (2001-01-11) cité dans la demande page 1, ligne 3 - page 2, ligne 14; revendications 1-5 page 4, ligne 18 - ligne 23 -----	1-24
A	EP 0 768 375 A (NESTLE SA) 16 avril 1997 (1997-04-16) page 2, ligne 16 - ligne 25; revendications 1,2 page 2, ligne 35 - ligne 41 -----	1-24

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR2004/000875

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 0101785	A	11-01-2001	FR 2795917 A1	12-01-2001
			AT 271782 T	15-08-2004
			AU 6294500 A	22-01-2001
			BR 0012154 A	12-03-2002
			CA 2389490 A1	11-01-2001
			CN 1359264 T	17-07-2002
			DE 60012524 D1	02-09-2004
			EP 1189517 A1	27-03-2002
			WO 0101785 A1	11-01-2001
			JP 2003503079 T	28-01-2003
			PL 353490 A1	17-11-2003
			ZA 200110384 A	23-07-2002
EP 0768375	A	16-04-1997	EP 0577904 A1	12-01-1994
			EP 0768375 A1	16-04-1997
			AT 172245 T	15-10-1998
			DE 69227329 D1	19-11-1998
			DE 69227329 T2	01-04-1999
			DK 768375 T3	23-06-1999
			ES 2124060 T3	16-01-1999
			AT 153063 T	15-05-1997
			AU 673525 B2	14-11-1996
			AU 4158793 A	13-01-1994
			CA 2099856 A1	07-01-1994
			CZ 9301343 A3	16-02-1994
			DE 69219768 D1	19-06-1997
			DK 577904 T3	27-10-1997
			ES 2102485 T3	01-08-1997
			FI 933002 A	07-01-1994
			GR 3024219 T3	31-10-1997
			HK 1000143 A1	24-12-1997
			HU 68567 A2	28-06-1995
			IE 930482 A1	12-01-1994
			JP 2916350 B2	05-07-1999
			JP 6315373 A	15-11-1994
			NO 932408 A	07-01-1994
			NZ 248057 A	28-08-1995
			PL 299542 A1	21-02-1994
			RO 115175 B1	30-11-1999
			RU 2126446 C1	20-02-1999
			SK 280682 B6	12-06-2000
			SK 71293 A3	06-07-1994
			US 5494664 A	27-02-1996
			US 5603930 A	18-02-1997