(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
31 juillet 2014 (31.07.2014)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2014/114805 A1

(51) Classification internationale des brevets :
A23K 1/00 (2006.01) *A23K 1/18* (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2014/051563

(22) Date de dépôt international :
28 janvier 2014 (28.01.2014)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
1350697 28 janvier 2013 (28.01.2013) FR

(71) Déposants : **INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE** [FR/FR]; 147, rue de l'Université, F-75007 Paris (FR). **DANSTAR FERMENT AG** [CH/CH]; Bahnhofstrasse 7, CH-6301 Zug (CH).

(72) Inventeurs : **FORANO, Evelyne**; 13 rue Barry, F-63670 La Roche Blanche (FR). **BERTIN, Yolande**; Chemin de la Bouteille, F-63540 Romagnat (FR). **MONTEL, Marie-Christine**; 49 boulevard Pont Rouge, F-15000 Aurillac (FR). **CHAUCHEYRAS-DURAND, Frédérique**; Le Bourg, F-63210 Aurieres (FR).

(74) Mandataire : **REGIMBEAU**; 139 rue Vendôme, F-69477 Lyon Cedex 06 (FR).

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

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

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :

— *relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv))*

Publiée :

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

WO 2014/114805 A1

(54) **Title** : USE OF *HAFNIA ALVEI* FOR REDUCING THE CARRIAGE OF *ESCHERICHIA COLI* PRODUCING SHIGA TOXINS (STEC) IN RUMINANTS

(54) **Titre** : UTILISATION *D'HAFNIA ALVEI* POUR REDUIRE LE PORTAGE DES ESCHERICHIA COLI PRODUISANT DES SHIGA TOXINES (STEC) CHEZ LES RUMINANTS

(57) **Abstract** : The invention relates to a method for reducing the risk of contamination of milk and meat when milking and slaughtering ruminants carrying STEC. The invention especially relates to a method for reducing the carriage of STEC by ruminants, characterised by the administration of at least one strain of *Hafnia alvei* to the ruminant. The invention also relates to a composition comprising at least one strain of *Hafnia alvei* combined with a strain of *Saccharomyces boulardii*.

(57) **Abrégé** : La présente invention concerne une méthode pour diminuer le risque de contamination du lait et de la viande lors de la traite et de l'abattage de ruminants porteurs de STEC. L'invention concerne en particulier une méthode pour diminuer le portage des STEC chez les ruminants, caractérisée par l'administration à un ruminant d'au moins une souche de *Hafnia alvei*. L'invention concerne également une composition comprenant au moins une souche d'Hafnia alvei en combinaison avec une souche de *Saccharomyces boulardii*.

UTILISATION *D'HAFNIA ALVEI* POUR REDUIRE LE PORTAGE DES ESCHERICHIA COLI PRODUISANT DES SHIGA TOXINES (STEC) CHEZ LES RUMINANTS

DOMAINE DE L'INVENTION

La présente invention concerne l'utilisation d'une souche de *Hafnia alvei* comme additif alimentaire en nutrition animale, pour réduire le portage des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines chez les ruminants.

ETAT DE LA TECHNIQUE

Les *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC), aussi nommées *Escherichia coli* entérohémorragiques (FEHEC), et plus particulièrement le sérogroupe O157 :H7, sont reconnus actuellement comme des pathogènes émergents importants en santé publique. Ces bactéries ont été détectées chez un grand nombre d'espèces animales sans que ces derniers ne présentent des signes cliniques de maladie. Les principaux « réservoirs » ou « porteurs » sont les ruminants et plus particulièrement les bovins. La prévalence des STEC dans les fèces des bovins varie de 4 à 36%. La persistance des souches de STEC dans les cheptels est due en partie au 'portage intestinal' par ces animaux. Le portage varie selon les saisons, la prévalence étant plus importante dans la période printemps-été.

Le risque de contamination des denrées d'origine animale, destinées à l'homme, est lié aux procédures d'hygiène dans les abattoirs et les ateliers de transformation, mais également à l'importance du portage animal. Ingérées par l'homme, ces bactéries provoquent le plus fréquemment des colites hémorragiques. Un syndrome hémolytique et urémique peut également apparaitre chez l'enfant et le sujet âgé, ainsi qu'un purpura thrombotique thrombocytopénique chez l'adulte.

Pour diminuer le portage des STEC par les ruminants, il a été proposé de leur administer des bactéries comme additif alimentaire, telles que des souches de *Lactobacillus acidophilus* qui diminuent la prévalence de *E. coli* O157 dans les fèces (Stephens et al., 2007 ; Tabe et al, 2008). Il a également été montré *in vitro* qu'une souche de *Lactobacillus acidophilus* et une souche de *Saccharomyces cerevisiae* diminuent la période de survie des STEC dans le fluide de la panse (ou rumen), le premier des compartiments du système digestif complexe des ruminants (Chaucheyras-Durand et al., 2010).

Hafnia alvei est une entérobactérie qui se trouve dans la flore digestive humaine et animale. Cette bactérie est utilisée dans l'industrie fromagère, pour reproduire le goût des fromages au lait cru dans des fromages préparés à base de lait pasteurisé (Delbès-Paus et al., 2012) ou encore pour permettre de réduire la croissance d'*E.coli* O26 :H11 dans le fromage (Delbès-Paus et al., 2013). *Hafnia alvei* est en particulier utilisée dans une composition pour l'aromatisation des fromages, comprenant également des *Lactobacillus* et au moins une levure (demande de brevet WO 99/43214). *Hafnia alvei* peut également être utilisée pour conserver des produits alimentaires, par inoculation, afin d'inhiber de manière compétitive le développement de bactéries pathogènes (US 5,869,113).

Il convient cependant de distinguer les propriétés de *Hafnia alvei* sur un produit animal qui est un aliment de son effet désiré chez l'animal sur pied. En particulier, un effet antagoniste mis en évidence en surface de viande ou en matrice fromagère ne permet pas de prédire un effet inhibiteur de la croissance-survie de STEC dans les conditions du tractus digestif animal ou d'un système modèle *in vitro* représentatif. En effet, les conditions physicochimiques d'une matrice fromagère et d'un contenu digestif animal sont très différentes (potentiel d'oxydo-réduction beaucoup plus bas dans le tube digestif qui est un milieu essentiellement anaérobie ; pH plus acide dans les fromages ; activité de l'eau (aw) plus basse en fromage, dû à l'ajout de sel ; substrats disponibles, à savoir lactose et autres sucres, protéines, matières grasses dans le lait alors que ce sont essentiellement des polysaccharides végétaux dans le tube digestif des ruminants). Les microorganismes qui y sont présents sont aussi très différents en termes d'espèces microbiennes présentes, de diversité et de niveaux de population ; les bactéries lactiques étant majoritaires dans le lait cru et dans les fromages (Masoude et al, 2012) alors que dans les écosystèmes digestifs des ruminants les principaux genres bactériens sont *Prevotella*, *Ruminococcus*, *Butyrivibrio*, *Clostridium* etc. (Jami & Mizrahi, 2012 ; de Olivera et al, 2013).

Ainsi, les inventeurs ont montré que les microorganismes suivants par exemple présentent un effet inhibiteur de la croissance des STEC (au moins égal à un log : différence de croissance d'une souche EHEC avec ou sans la souche inhibitrice) en matrice fromagère (PPNC ou pâte pressée non cuite), et en particulier des souches O157 :H7 ou O26 :H11, alors qu'ils n'ont pas d'effet inhibiteur sur ces souches incubées dans du contenu digestif animal *in vitro* : *Leuconostoc pseudomesenteroides*, souche MSE7 ; *Leuconostoc citreum*, souche MSE2 ; *Leuconostoc citreum*, souche MSE30.5 ; *Marinilactibacilli psychotolerans*, souche CRBM29 ; *Carnobacterium mobile*, souche CRBM18 ; *Enterococcus faecalis*, souche N688 ; *Macrococcus caseolyticus*, souche RP8 ; *Lactococcus lactis lactis*, souche 1147 ; *Lactococcus lactis lactis*, souche 278m ; *Lactococcus lactis cremoris*, souche N718 ; *Lactococcus lactis*, souche D5.3 ; *Lactobacillus plantarum*, souche FH3.

EXPOSE DE L'INVENTION

A ce jour, dans les élevages industriels, il n'existe pas de méthode pour diminuer le portage des STEC chez les ruminants. Le seul moyen de limiter la contamination du lait ou de la viande est de s'assurer d'une excellente hygiène lors de la traite ou de l'abattage des animaux. Une diminution du portage permettrait de diminuer les risques de contamination directe de l'homme par contact avec l'animal, ses produits dérivés ou via la consommation de végétaux souillés.

La présente demande est relative à une méthode pour diminuer les risques de contamination du lait ou de la viande issus de ruminants, lors de la traite ou de l'abattage des animaux porteurs de STEC. Les risques de contamination sont diminués en particulier en réduisant le portage de STEC par ces ruminants.

La présente invention est en particulier relative à une méthode pour diminuer le portage des STEC chez les ruminants, caractérisée par l'administration à un ruminant d'une ou plusieurs souches de l'espèce *Hafnia alvei*. Cette administration se fait aisément par voie orale, sous la forme d'un additif alimentaire.

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

L'invention concerne une méthode pour diminuer le portage des STEC chez les ruminants, en particulier des sérotypes O157:H7 et O26:H11, caractérisée par l'administration à un ruminant d'au moins une souche de *Hafnia alvei*.

Le terme « portage » ou « portage animal » désigne le fait que les bactéries STEC résident de façon naturelle dans l'organisme des animaux qui les « portent », sans leur causer de préjudice, notamment sans qu'aucun signe clinique de maladie ne soit décelable, bien que les fèces des animaux comprennent ces STEC. Bien que les animaux portent les bactéries STEC, la présente invention n'est pas relative à une méthode de traitement des animaux, mais à une méthode pour diminuer la quantité de STEC présentes dans les poches intestinales de ces animaux, et ainsi réduire le risque de contamination du lait lors de la traite, de la viande lors de l'abattage desdits animaux ou de leurs fèces.

Le terme « STEC » désigne des bactéries *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines ; ce groupe (tel que défini dans le rapport de l'AFSSA de 2003) comprend en particulier les sérogroupes O157:H7 et O26:H11.

Le terme « ruminants » désigne des animaux herbivores capables de régurgiter de la nourriture afin de la remastiquer, autrement dit de pratiquer la rumination. Par ruminants, on comprend essentiellement les animaux du sous-ordre des *Ruminantia*, et notamment les bovins, ovins et caprins. La présente invention concerne en particulier les bovins de rente.

Le terme « administration » désigne à la fois une administration par voie orale, par voie intraveineuse ou intramusculaire. La présente invention est néanmoins essentiellement relative à une administration par voie orale.

Le terme « souche(s) de *Hafnia alvei* » désigne toute souche, ou association de souches, appartenant à cette sous-famille des Hafnia, connue depuis les années 1960. Des souches *Hafnia* ont en particulier été isolées à partir de lait cru et de fromage. Deux grandes familles existent : les *Hafnia alvei* et les *Hafnia paralvei*. Certaines souches peuvent être virulentes (Abbott et al., 2011). Naturellement, la présente invention se rapporte à l'utilisation de souche(s) *d'Hafnia alvei* non virulente(s), non-pathogénique(s).

Selon un aspect préféré de l'invention, la ou les souche(s) est (sont) comprise(s) dans un additif alimentaire destiné aux ruminants. Un « additif alimentaire » se distingue d'un aliment par le fait qu'il est utilisé à faible dose dans l'alimentation des animaux. Les additifs alimentaires destinés à l'élevage animal font l'objet d'une réglementation en Europe (règlement CEn°1831/2003 du Parlement et du Conseil). Les industriels peuvent dans certaines conditions ajouter à la nourriture des animaux :

- agents dits *«additifs technologiques»* ; conservateurs, antioxygènes, émulsifiants, stabilisants, épaississants, gélifiants, liants, substances pour le contrôle de contamination de radionucléides, anti-agglomérants, correcteurs d'acidité, additifs pour l'ensilage, dénaturants ;
- additifs dits *« sensoriels »* ; colorants (dopant ou modifiant la couleur d'aliments pour animaux ; des substances qui, incluses dans l'alimentation des animaux donneront une couleur aux denrées alimentaires produites à partir de ces animaux. Certains pigments ayant *un effet positif sur la couleur des poissons ou oiseaux d'ornement* sont aussi autorisés) ;
- substances aromatiques ;
- *additifs nutritionnels*, dont vitamines, provitamines et *« substances à effet analogue chimiquement bien définies »*, composés d'oligo-éléments, acides aminés (et leurs sels et « *produits analogues* », ainsi que de l'urée et ses dérivés ;

- additifs dits «zootechniques», autorisés comme améliorateurs de digestibilité, stabilisateurs de la flore intestinale, substances ayant un *«effet positif sur l'environnement»*, et d'«autres additifs zootechniques».

Préférentiellement, l'additif alimentaire comprenant la (les) souche(s) *d'Hafnia alvei* sera mélangé à un aliment destiné aux ruminants. De préférence, la (les) souche(s) de *Hafnia alvei* est sous forme lyophilisée, et notamment sous forme de poudre, pour être additionnée aisément à cet aliment.

Selon un aspect particulier de l'invention, ledit aliment ou composition alimentaire ou additif alimentaire comprend au moins environ 10^8 UFC de *Hafnia alvei* par jour et par animal, avantageusement d'environ 10^8 UFC à environ 10^{12} UFC de *Hafnia alvei* par jour et par animal. Chez les bovins, la dose préférée est d'environ 10^{10} UFC par jour et par animal et chez les ovins et caprins, la dose préférée est d'environ 10^9 UFC par jour et par animal. Le terme « UFC » signifie « Unité Formant Colonie » et est l'unité de mesure généralement reconnue par l'homme du métier pour quantifier les bactéries capables de fonder une colonie.

En particulier, la composition alimentaire pourra comprendre d'autres additifs alimentaires choisis parmi les additifs cités précédemment, et/ou parmi les principes actifs suivants : des hormones et/ou agents anti-inflammatoires et/ou des agents bactéricides et/ou des agents anti-fongiques.

Selon un aspect de l'invention, la souche de *Hafnia alvei* administrée à un ruminant est choisie parmi les souches déposées auprès de la DSMZ sous les numéros d'accès 30098, 30099 ou 30163.

Selon un aspect préféré de l'invention, la souche de *Hafnia alvei* administrée à un ruminant est la souche B16 déposée à la CNCM sous le numéro CNCM I-4710 en date du 20/12/2012. Cette souche, précédemment dénommée 'CC16', a été isolée en 2009 à partir d'un fromage livarot (Mounier et *al.*, 2009).

Selon un aspect spécifique de l'invention, la souche de *Hafnia alvei* est administrée en combinaison avec au moins une autre souche de microorganisme, et notamment une autre souche de *Hafnia alvei* et/ou une levure. Dans le cas d'une combaison avec une levure, la levure est en particulier la souche de *Saccharomyces boulardii* déposée sous le numéro d'accès I-1079 à la CNCM.

Selon un autre aspect spécifique de l'invention, plusieurs souches de *Hafnia alvei* sont associées pour être administrées à un ruminant dans le cadre de la méthode selon l'invention.

L'invention est également relative à une composition comprenant une souche *d'Hafnia alvei* en combinaison avec au moins une autre souche de microorganisme. En particulier, cette autre souche de microorganisme est une autre souche de *Hafnia alvei* et/ou une levure. De manière préférée, cette levure est de l'espèce particulière *Saccharomyces boulardii*. En particulier la souche de *Saccharomyces boulardii* présente dans la composition est la souche déposée sous le numéro d'accès I-1079 à la CNCM.

En particulier, la souche de *Hafnia alvei* présente dans ladite composition est la souche B16 déposée sous le numéro d'accès I-4710 à la CNCM, en association avec la souche de *Saccharomyces boulardii* déposée sous le numéro d'accès I-1079 à la CNCM.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la composition comprend une souche de *Hafnia alvei,* notamment l'une des souches déposées sous le numéro d'accès 30098, 30099 ou 30163 auprès de la DSMZ, et la souche de *Saccharomyces boulardii* déposée sous le numéro d'accès I-1079 à la CNCM.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la composition comprend de plus au moins une autre souche de microorganisme. Cet autre microorganisme peut être en particulier une souche de *Hafnia alvei,* notamment l'une des souches déposées sous le numéro d'accès 30098, 30099 ou 30163 auprès de la DSMZ, ou tout autre microorganisme approprié.

Selon un autre mode de réalisation, la composition comprend la souche B16 déposée sous le numéro d'accès I-4710 à la CNCM, au moins une souche déposée sous le numéro d'accès 30098, 30099 ou 30163 auprès de la DSMZ, et la souche de *Saccharomyces boulardii* déposée sous le numéro d'accès I-1079 à la CNCM.

L'invention est également relative à une utilisation de l'une des compositions telles que définies ci-dessus, comme additif alimentaire pour des ruminants. Cette composition sera préférentiellement ajoutée à un aliment pour les animaux. Cette composition sera utilisée pour diminuer le portage des STEC chez les animaux ruminants, nourris avec cette composition.

Enfin, l'invention concerne l'utilisation d'une souche de *Hafnia alvei,* seule ou en combinaison avec d'autres souches de microorganismes, pour diminuer le portage des STEC chez les ruminants.

Le portage des STEC chez les ruminants est évalué par des méthodes classiques, bien connues de l'homme du métier. En particulier, l'importance du portage *in vivo* est évaluée en mesurant la prévalence des STEC présentes au sein d'un troupeau, et le taux et/ou la durée d'excrétion des STEC dans les fécès des animaux, tel que décrits dans (Tabe *et al.,* 2008) par exemple. La méthode selon l'invention permet d'obtenir une diminution de l'excrétion fécale d'au

moins 10% par rapport à des ruminants n'ayant pas absorbé au moins une souche *d'Hafnia alvei* ; préférentiellement la diminution est d'au moins 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 120%, 150%, 200%, et même de 300%. De manière préférée, la prévalence des STEC et en particulier des sérotypes O157:H7 et 026:H11 chez les animaux auxquels au moins une souche *d'Hafnia alvei* a été administrée est diminuée d'environ 30% par rapport à la prévalence des STEC chez des animaux n'ayant pas été traités selon la méthode de l'invention. L'effet d'inhibition de croissance des STEC par une souche *d'Hafnia alvei* peut également être démontré *in vitro*, par croissance des souches dans un jus iléal bovin, tel que cela est présenté dans les exemples ci-dessous.

DESCRIPTION DES FIGURES

Figure 1. Croissance d'*E. coli* O157 :H7 FCH6 en jus iléal bovin seule (gris foncé) ou en présence d'une souche de *Hafnia alvei* (gris clair)

Figure 2. Croissance d'E. coli O26 :H11 21765 en jus iléal bovin seule (gris foncé) ou en présence d'une souche de *Hafnia alvei* (gris clair)

Figure 3. Croissance d'*E. coli* O157 :H7 FCH6 et 21765 en jus iléal bovin (gris foncé) et en présence d'un mélange de *Hafnia alvei* B16 et de la levure *S. boulardii* I-1079 (gris clair)

Figure 4. Croissance d'*E. coli* O157 :H7 FCH6 en jus iléal bovin seule (gris foncé) ou en présence d'un mélange de deux souches de *Hafnia alvei* B16 et 30098 (gris clair)

EXEMPLES

Exemple 1. Effet de *Hafnia alvei* B16 et d'autres souches d'*Hafnia alvei* sur la croissance d'*E. coli* O157:H7 FCH6 en jus iléal bovin

Les incubations *in vitro* ont été réalisées en jus iléal obtenu chez deux vaches canulées recevant une ration (80/20 respectivement) de foin de prairie naturelle et de concentré [concentré INRA 863-50183 GV, comprenant pulpe de betteraves, blé, orge, tourteau de colza, tourteau de soja, mélasse de canne à sucre, phosphate bicalcique, sel, magnésie, vitamines,

provitamines et oligo-éléments]. Les tubes contenant le jus iléal ont été incubés pendant 5 heures à 39°C, sans agitation, en présence des souches d'intérêt.

L'effet inhibiteur potentiel de chaque souche candidate a été tout d'abord testé sur une souche O157:H7 (souche FCH6), rendue résistante à la rifampicine. Le dénombrement de la souche FCH6 avant et après 5 heures d'incubation a été réalisé sur milieu LB Agar supplémenté en rifampicine.

Dans notre étude, un ajout de 500 µl d'une culture de 24h d'*Hafnia alvei* B16 en milieu BHI (non agité) dans 5 ml de jus iléal inoculé avec 10^4 ufc/ml de FCH6 Rif^R a permis de réduire de façon significative ($P<0.001$) et reproductible la croissance de la souche STEC en 5 heures d'incubation (-0.55 Log de population en moyenne sur 11 incubations indépendantes, voir figure 1). Les autres souches d'*Hafnia alvei* testées (souches DSMZ 30098, 30099 et 30163) présentent également un effet inhibiteur.

Les résultats présentés en figure 1 indiquent que la souche *Hafnia alvei* B16, présente une bonne capacité antagoniste de la croissance de la souche *E. coli* O157:H7.

Exemple 2. Effet de *Hafnia alvei* B16 et d'autres souches d'*Hafnia alvei* sur la croissance d'*E. coli* O26 :H11 21765 en jus iléal bovin

Des résultats comparables ont été obtenus avec une autre souche STEC de sérotype O26 :H11 (souche 21765 Rif^R). Une baisse de croissance significative ($P<0.05$) de -0.66 Log de population (moyenne sur 9 incubations indépendantes, figure 2) a été en effet mesurée en 5 heures d'incubation en jus iléal bovin avec la souche B16. Les autres souches de *Hafnia alvei* testées (souches DSMZ 30098, 30099 et 30163) présentent également un effet inhibiteur sur la souche 21765.

Exemple 3. Effet de *Hafnia alvei* B16 en combinaison avec une souche de levure sur la croissance *d'E. coli* O157 :H7 FCH6 et *E. coli* O26 :H11 21765 en jus iléal bovin.

Les conditions expérimentales sont identiques à celles décrites dans l'exemple 1, à l'exception de ce qui suit : les souches inhibitrices sont rajoutées à la quantité de 250 µl chacune, et *Saccharomyces boulardii* est préalablement cultivé en bouillon au malt pendant 24 h à 30°C, sous agitation douce.

Les résultats sont présentés en figure 3 : pour la souche FCH6, la diminution de la croissance est de presque 1 log (diminution d'un facteur 10) ; pour la souche 21765, la diminution de la croissance est de -0.5 log.

Exemple 4. Effet d'une combinaison de deux souches de *Hafnia alvei* (B16 et 30098) sur la croissance d'*E. coli* O157:H7 FCH6 en jus iléal bovin.

Les conditions expérimentales sont identiques à celles décrites dans l'exemple 1, les deux souches sont ajoutées à raison de 250 µl chacune.

Les résultats sont présentés en figure 4 : pour la souche FCH6, la diminution de la croissance est de 1 log (diminution d'un facteur 10) en présence de la combinaison des deux souches *d'Hafnia alvei*.

Exemple 5. Vérification de la survie de la souche *H. alvei* B16 dans le contenu iléal *in vitro*

La survie de la souche *Hafnia alvei* testée dans les exemples 1 à 4 ci-dessus (B16) dans le contenu iléal *in vitro* comprenant la flore intestinale endogène a été vérifiée, notamment avec 10^8 CFU/ml d'*Hafnia alvei*. Les conditions expérimentales sont identiques à celles décrites dans l'exemple 1, à l'exception de l'inoculation avec les souches *E.coli*.

Les résultats obtenus montrent que la quantité de *Hafnia alvei* B16 se maintient au même niveau dans le jus intestinal *in vitro* pendant plus de 5 heures (résultats non représentés).

REFERENCES

Demande De Brevet/Brevet

WO 99/43214

US 5,869,113

Références Bibliographiques *par ordre alphabétique*

AFSSA (2003) Bilan des connaissances relatives aux Escherichia coli producteurs de Shiga-toxines (STEC).

Chaucheyras-Durand F, Faqir F, Ameilbonne A, Rozand C, Martin C. *Fates of acid-resistant and non-acid-resistant Shiga toxin-producing Escherichia coli strains in ruminant digestive contents in the absence and presence of probiotics.* Appl Environ Microbiol. 2010 Feb;76(3):640-7.

Delbès-Paus C, Pochet S, Helinck S, Veisseire P, Bord C, Lebecque A, Coton M, Desmasures N, Coton E, Irlinger F, Montel MC. *Impact of Gram-negative bacteria in interaction with a complex microbial consortium on biogenic amine content and sensory characteristics of an uncooked pressed cheese.* Food Microbiol. 2012 May;30(1):74-82. Epub 2011 Dec 14.

Delbès-Paus C, Miszczycha S, Ganet S, Helinck S, Veisseire P, Pochet S, Thévenot D, Monter MC, *Behavior of Escherichia coli O26:H11 in the presence of Hafnia alvei in a model cheese ecosystem*, Int. J. Food Microbiol. 2013 160, 212-218.

de Oliveira MN, Jewell KA, Freitas FS, Benjamin LA, Tótola MR, Borges AC, Moraes CA, Suen G. Characterizing the microbiota across the gastrointestinal tract of a Brazilian Nelore steer. Vet Microbiol. 2013 Jun 28;164(3-4):307-14.

Jami E, Mizrahi I. Composition and similarity of bovine rumen microbiota across individual animals. PLoS One. 2012;7(3):e33306.

Masoud W, Vogensen FK, Lillevang S, Abu Al-Soud W, Sørensen SJ, Jakobsen M. The fate of indigenous microbiota, starter cultures, Escherichia coli, Listeria innocua and Staphylococcus aureus in Danish raw milk and cheeses determined by pyrosequencing and quantitative real time (qRT)-PCR. Int J Food Microbiol. 2012 Feb 1;153(1-2):192-202.

Mounier J, Monnet C, Jacques N, Antoinette A, Irlinger F. *Assessment of the microbial diversity at the surface of Livarot cheese using culture-dependent and independent approaches.* Int J Food Microbiol. 2009 Jul 31;133(1-2):31-7.

Stephens TP, Loneragan GH, Karunasena E, Brashears MM. *Reduction of Escherichia coli O157 and Salmonella in feces and on hides of feedlot cattle using various doses of a direct-fed microbial.* J Food Prot. 2007 Oct;70(10):2386-91.

Tabe ES, Oloya J, Doetkott DK, Bauer ML, Gibbs PS, Khaitsa ML. *Comparative effect of direct-fed microbials on fecal shedding of Escherichia coli O157:H7 and Salmonella in naturally infected feedlot cattle.* J Food Prot. 2008 . 71(3):539-44. Erratum in: J Food Prot. 2008. 71(5):886.

PCT

Imprimé (original sous forme électronique)
(Cette feuille ne fait pas partie de la demande internationale ni ne compte comme une feuille de celle-ci)

0-1	**Formulaire PCT/RO/134 (SAFE) Indications relatives à des micro-organismes ou autre matériel biologique déposés (règle 13bis du PCT)**	
0-1-1	Préparée avec	PCT Online Filing Version 3.5.000.235 MT/FOP 20020701/0.20.5.20
0-2	**Demande internationale n°**	PCT/EP2014/051563
0-3	**Référence du dossier du déposant ou du mandataire**	364791D31348

1	**Les indications ci-dessous ont trait au micro-organisme ou autre matériel biologique visé dans la description :**	
1-1	**page**	5
1-2	**ligne**	23
1-3	**Identification du dépôt**	
1-3-1	Nom de l'institution de dépôt	CNCM Collection nationale de cultures de micro-organismes
1-3-2	Adresse de l'institution de dépôt	FR- Institut Pasteur, 28, rue du Dr Roux, F-75724 Paris Cedex 15
1-3-3	Date du dépôt	20 Decembre 2012 (20.12.2012)
1-3-4	Numéro d'ordre	CNCM I-4710
1-5	**Etats désignés pour lesquels les indications sont données**	De toutes les désignations

RÉSERVÉ À L'OFFICE RÉCEPTEUR

0-4	**Cette feuille a été reçue en même temps que la demande internationale :** (oui ou non)	Oui
0-4-1	Fonctionnaire autorisé	Wilson, Patrick

RÉSERVÉ AU BUREAU INTERNATIONAL

0-5	**Cette feuille est parvenue au Bureau international le :**	
0-5-1	Fonctionnaire autorisé	

**RO/EP

REVENDICATIONS

1. Méthode pour diminuer le portage des STEC chez les ruminants, caractérisée par l'administration à un ruminant d'au moins une souche de *Hafnia alvei*.
2. Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite souche est comprise dans un additif alimentaire destiné aux ruminants.
3. Méthode selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que ladite souche de *Hafnia alvei* est administrée à une quantité d'au moins environ 10^8 UFC par jour et par animal.
4. Méthode selon la revendication 3, caractérisée en ce que ladite souche de *Hafnia alvei* est administrée chez les bovins à une quantité d'environ 10^{10} UFC par jour et par animal.
5. Méthode selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que la souche de *Hafnia alvei* est la souche B16 déposée à la CNCM sous le numéro I-4710.
6. Méthode selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que ladite souche est administrée en combinaison avec au moins une autre souche de microorganisme.
7. Méthode selon la revendication 6, caractérisée en ce que l'autre souche est choisie parmi une autre souche de *Hafnia alvei* et/ou une levure.
8. Méthode selon la revendication 7, caractérisée en ce que la levure est la souche de *Saccharomyces boulardii* déposée sous le numéro d'accès I-1079 à la CNCM.
9. Composition comprenant une souche *d'Hafnia alvei* en combinaison avec une souche de *Saccharomyces boulardii*.
10. Composition selon la revendication 9, caractérisée en ce que la souche *d'Hafnia alvei* est la souche B16 déposée à la CNCM sous le numéro I-4710, et la souche de *Saccharomyces boulardii* est la souche déposée sous le numéro d'accès I-1079 à la CNCM.
11. Composition selon l'une des revendications 9 ou 10, comprenant de plus au moins une autre souche de microorganisme.
12. Utilisation de la composition selon l'une des revendications 9 à 11 comme additif alimentaire pour des ruminants.
13. Utilisation d'une souche de *Hafnia alvei* pour diminuer le portage des STEC chez les ruminants.

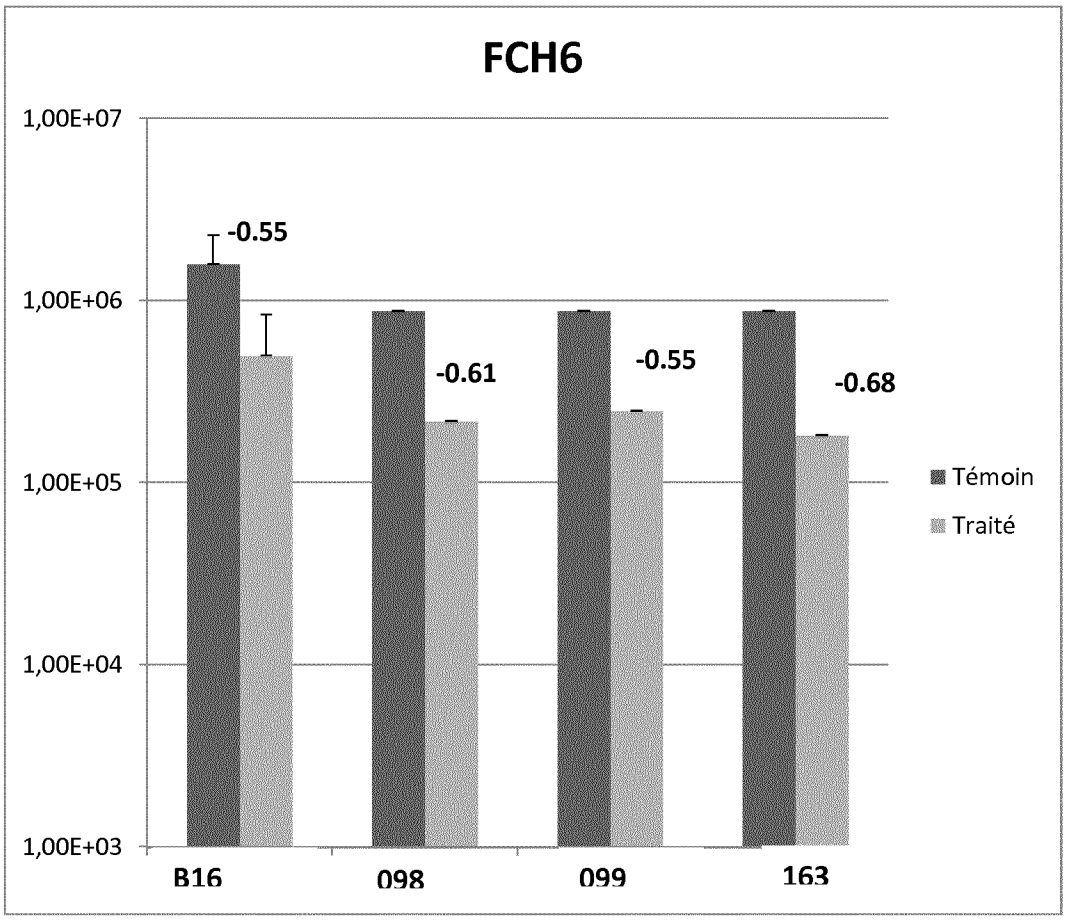

FCH6
1,00E+07
1,00E+06
1,00E+05
1,00E+04
1,00E+03
-0.55
-0.61
-0.55
-0.68
B16
098
099
163
Témoin
Traité

Figure 1

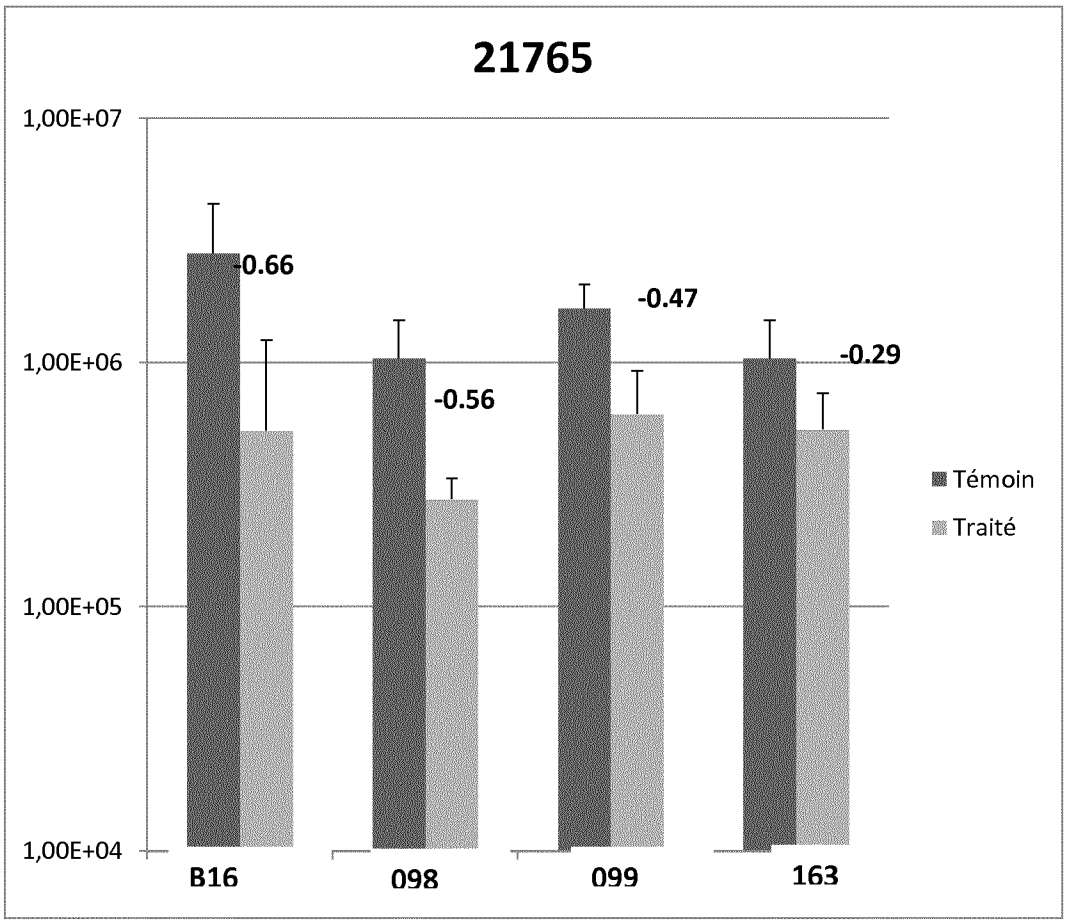
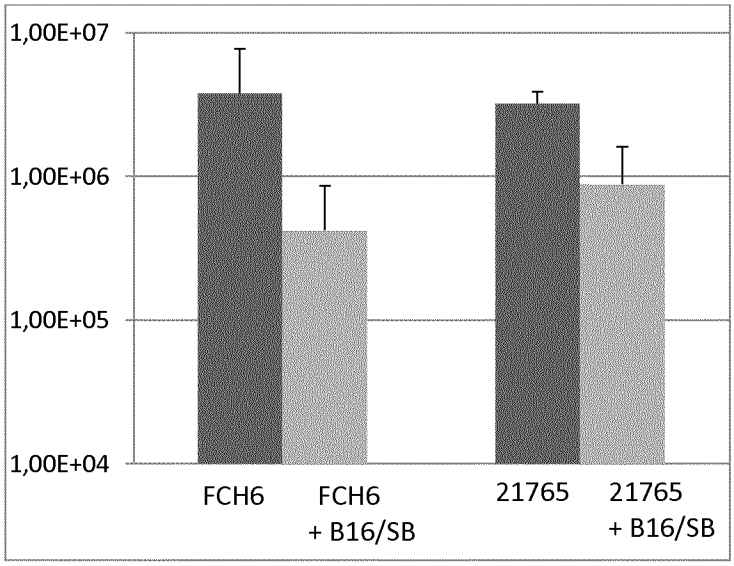
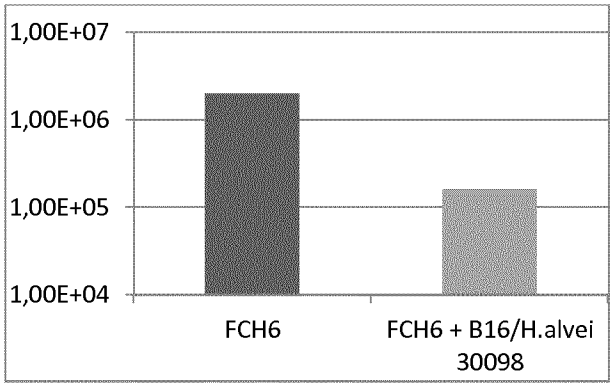

21765
1,00E+07
1,00E+06
1,00E+05
1,00E+04
-0.66
-0.56
-0.47
-0.29
B16
098
099
163
Témoin
Traité

Figure 2



n=5 pour chaque souche STEC

Figure 3



n=2 pour FCH6

Figure 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2014/051563

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A23K1/00 A23K1/18
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A23K A23L A23B A23C

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 869 113 A (CLAYTON ROBERT PAUL [US] ET AL) 9 February 1999 (1999-02-09) column 4, line 39 - line 47 column 12, line 9 - line 23; claims	1-13
X	DELBES-PAUS C ET AL: "Behavior of Escherichia coli O26:H11 in the presence of Hafnia alvei in a model cheese ecosystem", 1 January 2013 (2013-01-01), INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY, VOL. 160, NR. 3, PAGE(S) 212-218, XP002697100, ISSN: 0168-1605(print) DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.10.019, abstract	1-13

-/--

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

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
21 February 2014	03/03/2014

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

1

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

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; July 2006 (2006-07), BUTS JEAN-PAUL ET AL: "Saccharomyces boulardii produces in rat small intestine a novel protein phosphatase that inhibits Escherichia coli endotoxin by dephosphorylation", XP002697101, Database accession no. PREV200600373614 abstract & BUTS JEAN-PAUL ET AL: "Saccharomyces boulardii produces in rat small intestine a novel protein phosphatase that inhibits Escherichia coli endotoxin by dephosphorylation", PEDIATRIC RESEARCH, vol. 60, no. 1, July 2006 (2006-07), pages 24-29, ISSN: 0031-3998 -----	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2014/051563

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5869113 A	09-02-1999	US 5869113 A	09-02-1999
		US 6039984 A	21-03-2000

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/EP2014/051563

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
INV. A23K1/00 A23K1/18
ADD.

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
A23K A23L A23B A23C

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US 5 869 113 A (CLAYTON ROBERT PAUL [US] ET AL) 9 février 1999 (1999-02-09) colonne 4, ligne 39 - ligne 47 colonne 12, ligne 9 - ligne 23; revendications -----	1-13
X	DELBES-PAUS C ET AL: "Behavior of Escherichia coli O26:H11 in the presence of Hafnia alvei in a model cheese ecosystem", 1 janvier 2013 (2013-01-01), INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY, VOL. 160, NR. 3, PAGE(S) 212-218, XP002697100, ISSN: 0168-1605(print) DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.10.019, abrégé -----	1-13

-/--

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

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

* Catégories spéciales de documents cités:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
21 février 2014	03/03/2014

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

1

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; juillet 2006 (2006-07), BUTS JEAN-PAUL ET AL: "Saccharomyces boulardii produces in rat small intestine a novel protein phosphatase that inhibits Escherichia coli endotoxin by dephosphorylation", XP002697101, Database accession no. PREV200600373614 abrégé & BUTS JEAN-PAUL ET AL: "Saccharomyces boulardii produces in rat small intestine a novel protein phosphatase that inhibits Escherichia coli endotoxin by dephosphorylation", PEDIATRIC RESEARCH, vol. 60, no. 1, juillet 2006 (2006-07), pages 24-29, ISSN: 0031-3998 -----	1-13

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°
PCT/EP2014/051563

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5869113 A	09-02-1999	US 5869113 A	09-02-1999
		US 6039984 A	21-03-2000