

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
—
**INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE**
—
COURBEVOIE
—

①① N° de publication : **3 097 741**

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national : **19 06844**

⑤① Int Cl⁸ : **A 61 K 35/74 (2019.01)**, A 61 K 33/00, A 61 K 31/05,
A 61 K 9/02, A 61 K 9/107, A 61 K 9/20, A 61 K 9/50, A 61 P
1/00, A 61 P 3/00, A 61 P 9/00, A 61 P 11/00, A 61 P 17/00,
A 61 P 21/00, A 61 P 25/00, A 61 P 29/00, A 61 P 35/00

①②

BREVET D'INVENTION

B1

⑤④ Bactérie du genre *Massiliomicrobiota* et composition en contenant pour son utilisation comme médicament.

②② Date de dépôt : 25.06.19.

③③ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public
de la demande : 01.01.21 Bulletin 20/53.

④⑤ Date de la mise à disposition du public du
brevet d'invention : 25.06.21 Bulletin 21/25.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche :

Se reporter à la fin du présent fascicule

⑥⑥ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

Demande(s) d'extension :

⑦① Demandeur(s) : *LNC THERAPEUTICS Société
anonyme* — FR.

⑦② Inventeur(s) : RAWADI Georges, CLAUD Sandrine
et RINALDI Laure.

⑦③ Titulaire(s) : *LNC THERAPEUTICS Société
anonyme.*

⑦④ Mandataire(s) : AQUINOV.

FR 3 097 741 - B1



Description

Titre de l'invention : Bactérie du genre *Massiliomicrobiota* et composition en contenant pour son utilisation comme médicament

[0001] L'invention concerne l'utilisation comme médicament chez l'être humain ou l'animal, de bactéries du genre *Massiliomicrobiota* et/ou de compositions en contenant, notamment dans la prévention et/ou le traitement de maladies inflammatoires chroniques, de cancers, de l'obésité, des maladies rénales, une perte de masse musculaire pathologique, des maladies caractérisées par une perte de masse musculaire pathologique, des maladies caractérisées par une dysfonction endothéliale, des maladies induites par une instabilité des cytochromes P450.

[0002] Il existe de nombreuses maladies pour lesquelles il n'existe pas de traitement satisfaisant, tant en termes d'efficacité que d'effets secondaires ou de facilité de fabrication.

[0003] Parmi ces pathologies, on peut citer notamment les maladies inflammatoires chroniques, les cancers, l'obésité, les maladies rénales, une perte de masse musculaire pathologique, les maladies caractérisées par une perte de masse musculaire pathologique, les maladies caractérisées par une dysfonction endothéliale, les maladies induites par une instabilité des cytochromes P450.

[0004] L'inflammation est le processus normal de défense de l'organisme face à une agression. Elle permet de lutter et d'éliminer le ou les agents étrangers à l'origine de ladite agression. Cette inflammation, dite aiguë, est réversible et n'a qu'une durée limitée allant de quelques minutes à quelques jours. Toutefois, dans certains cas, le processus inflammatoire se dérègle et l'inflammation devient chronique. Au lieu de contribuer à la défense de l'organisme, les acteurs impliqués dans le processus inflammatoire deviennent dangereux et entraînent un état pathologique souvent grave et invalidant. Les maladies inflammatoires chroniques sont donc des maladies dont la physiopathologie est directement liée à une inflammation, ladite inflammation étant d'origine auto-immune et/ou auto-inflammatoire.

Tous les organes peuvent être concernés par une inflammation chronique, comme par exemple le système digestif (maladie de Crohn, colite ulcéreuse, gastrite auto-immune, etc.), le foie (hépatite, NAFLD, NASH, stéatohépatite non alcoolique, etc.), le pancréas (pancréatite), les poumons (asthme), la peau (dermatite atopique comme le psoriasis), le système nerveux (scléroses en plaques), les articulations (polyarthrites). Par ailleurs, l'inflammation chronique est également présente dans d'autres situations où d'autres mécanismes sont en cause comme en particulier les cancers.

L'inflammation chronique, et en particulier les maladies chroniques inflammatoires,

touchent une large portion de la population, dans des proportions variées en fonction de la pathologie concernée. Les conséquences pour la santé sont majeures, car ces maladies, bien qu'à évolution lente, sont invalidantes, douloureuses et associées à un risque élevé de mortalité précoce.

Actuellement, les traitements proposés pour ces maladies sont des anti-inflammatoires, des immunomodulateurs et/ou immunosuppresseurs. On peut citer par exemple :

- les médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens tels que ibuprofène, naproxène et aspirine qui sont dédiés à un usage de courte durée et qui sont inadaptés aux douleurs chroniques,
- les modulateurs du métabolisme des purines qui sont des immunomodulateurs, tels que méthotrexate et azathioprine,
- des médicaments biologiques tels que des anti-TNF α , des antagonistes des récepteurs à l'IL1 et IL6, ou encore
- la sulfasalazine.

Tous ces médicaments ont des taux de réponse très variables du fait de la dégradation des molécules lorsqu'elles sont administrées et présentent des effets secondaires importants. De plus, les immunomodulateurs entravent la réponse immunitaire normale et saine face aux pathogènes, si bien que les patients traités sont sensibles aux infections. Le méthotrexate quant à lui est spécifiquement connu pour ses effets indésirables sur la production de sperme et par conséquent sur la fertilité.

[0005] Un premier objectif de l'invention est donc de pallier aux inconvénients des traitements actuels de l'inflammation chronique.

[0006] L'obésité correspond à un excès de masse grasse qui entraîne des inconvénients pour la santé et réduit l'espérance de vie. L'obésité devient irréversible lorsqu'elle est installée, en particulier l'obésité morbide, donc prévenir son développement est primordial. Cette maladie résulte d'un déséquilibre entre les apports et les dépenses énergétiques. Ce déséquilibre entraîne une augmentation des réserves stockées dans le tissu graisseux, entraînant de nombreuses complications telles que des désordres hormonaux, des désordres de différents types cellulaires en plus des adipocytes comme les cellules souches, les lymphocytes et autres cellules du système immunitaire, les cellules vasculaires, les terminaisons nerveuses, etc. Ces complications résultent de l'apparition de certaines maladies chez les patients et animaux obèses telles que l'une des pathologies suivantes : le diabète de type 2, l'hypertension artérielle, la dyslipidémie, les accidents cardiovasculaires, le syndrome de l'apnée du sommeil et autres maladies respiratoires, l'arthrose et autres maladies articulaires. L'axe intestin-cerveau est perturbé et tous les organes peuvent être altérés. De plus, l'obésité est associée à certains cancers, et à des faiblesses psychologiques qui ont un impact social pour le patient.

Le traitement de l'obésité est basé sur une prise en charge globale prenant en compte les dimensions comportementales et environnementales. Cependant selon l'importance de l'excès de gras, la nature du gras (taille des cellules, degré d'inflammation, etc.), la distribution du gras (en particulier le gras viscéral étant le plus dangereux), les traitements ne sont pas toujours adaptés et les résultats non significatifs.

Par ailleurs, les traitements médicaux sont très spécifiques et ont de nombreux effets secondaires lourds. Il existe également la possibilité de recourir à la chirurgie de l'obésité, pour les formes les plus sévères de l'obésité, qui sont associées à de graves complications sur l'état de santé du patient. Des effets secondaires lourds sont aussi observés pour ce type de traitement, tels que des traces de graisses anales, gaz avec suintement gras, envies impérieuses de déféquer, selles grasses et/ou abondantes, émission de graisses ou de selles par l'anus, maux de tête, fatigue, menstruations irrégulières, anxiété, problème gingival ou dentaire, infection respiratoire, grippe, infection urinaire, hypoglycémie, éruption cutanée, augmentation de transaminases, hémorragie rectale, hépatite, pancréatite, insuffisance rénale ; indigestion, incapacité à tolérer certains aliments, problème de transit, renvois, occlusions intestinales, inflammations de la vésicule biliaire, « dumping syndrome », carences nutritionnelles, anémies.

[0007] Un autre objectif de l'invention est donc de proposer une alternative efficace aux produits de traitement de l'obésité existant actuellement.

[0008] Le cancer est une maladie caractérisée par la prolifération incontrôlée de cellules, liée à un échappement aux mécanismes de régulation qui assure le développement harmonieux de notre organisme.

Cette prolifération incontrôlée peut toucher toutes les cellules de l'organisme. Il y a donc de nombreux cancers : cancer du poumon, du sein, de la prostate, du côlon et du rectum, de la thyroïde, du col de l'utérus, de l'endomètre et des ovaires, de la lèvre-bouche-larynx, du rein, du foie, du cerveau, des testicules, du pancréas, des os, de la peau, du sang (leucémies), lymphomes, de l'intestin grêle, de l'estomac, de la plèvre, de l'œsophage, de la vessie, de la peau (mélanomes).

Les principaux traitements des cancers sont la chimiothérapie et la radiothérapie, qui ont une efficacité limitée permettant un faible taux de survie et des effets secondaires très lourds tels que la chute de cheveux, des nausées et vomissements, diarrhées, baisse des globules blancs, globules rouges et plaquettes, lésions de la bouche, sensations d'engourdissement ou de fourmillement dans les mains ou pieds, troubles cutanés et syndrome main-pied, modification de la couleur et une fragilisation des ongles, douleurs musculaires et articulaires, troubles du cycle menstruel, troubles cardiaques, fatigue, réactions allergiques, altération de cellules saines par irradiation des tissus sains à côté de la tumeur, troubles sexuels, problèmes de fertilité, réaction in-

flammatoire, effets sur les cellules du sang.

[0009] Un autre objectif de l'invention est donc de proposer un traitement efficace des cancers et dépourvu d'effets secondaires.

[0010] L'insuffisance rénale chronique est une maladie dont la pathophysiologie est directement liée à la destruction des cellules du rein. Cette destruction des cellules rénales conduisant à une insuffisance rénale est provoquée par une néphropathie. Il existe différents types de néphropathies, telles que notamment les néphropathies vasculaires et hypertensives, les néphropathies diabétiques essentiellement diabète type 2, les glomérulonéphrites chroniques, les néphropathies héréditaires essentiellement polykystose rénale autosomique dominante, les néphropathies interstitielles chroniques, les néphropathies diverses et les néphropathies d'origine indéterminée.

L'insuffisance rénale chronique touche une large portion de la population. Les conséquences pour la santé sont majeures, car il s'agit d'une pathologie invalidante, douloureuse et associée à un risque élevé de mortalité précoce.

Actuellement, le traitement de l'insuffisance rénale chronique repose :

- sur la prise en charge de la maladie d'origine de l'insuffisance rénale (hypertension artérielle, diabète, polykystose, etc.) qui est souvent à un stade très avancé lors du diagnostic d'insuffisance rénale chronique,

- sur le ralentissement de l'évolution vers l'insuffisance rénale chronique en protégeant les reins,

- sur des interventions destinées à ralentir la progression des maladies rénales chroniques notamment par le contrôle strict de la pression artérielle, par la diminution de la protéinurie, par l'utilisation d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion ou de bloqueurs des récepteurs de type 1 de l'angiotensine II, par la prévention des épisodes d'insuffisance rénale aiguë et de la néphrotoxicité, par la restriction protidique modérée et adaptée au patient, par le contrôle d'un diabète s'il existe et l'arrêt du tabac,

- sur la dialyse et la greffe des reins si le stade d'insuffisance rénale terminale est atteint.

Toutefois, ces différents traitements ont des taux de réponse très variable, en particulier du fait du nombre important de facteurs intervenant dans l'apparition de l'insuffisance rénale chronique et du fait de la dégradation des molécules lorsqu'elles sont administrées. En outre ces traitements présentent des effets secondaires importants tels que maux de tête, nausées, fatigue, hypoglycémie, rétention hydrosodée, effets secondaires digestifs (flatulences), hypotension, perte de muscle, une hyperkaliémie, œdème angioneurotique, foetotoxicité, fatigue, crampes, troubles du sommeil, démangeaisons, sténoses, thrombose, lymphocèle, hématome, tubulonéphrite aiguë, rejet de greffe, diabète, augmentation du risque de cancer, risque de maladies cardio-vas-

culaires, maladies hépatiques.

[0011] Ainsi, un autre objectif de l'invention est de proposer un traitement efficace de l'insuffisance rénale chronique, qui fonctionne quel que soit le facteur d'origine de la maladie, qui soit facile à administrer, et qui ne présente pas d'effets secondaires.

[0012] Les cellules endothéliales qui tapissent la surface luminale des vaisseaux sanguins ont un rôle déterminant dans la régulation de l'homéostasie vasculaire principalement via la formation de puissants facteurs vasodilatateurs. La réduction de ces facteurs vasodilatateurs entraîne une réduction des relations endothélium-dépendantes et entraîne une dysfonction endothéliale.

La dysfonction endothéliale est observée dans de nombreuses pathologies vasculaires comme l'hypertension artérielle, les dyslipidémies, les diabètes, le syndrome métabolique, l'artériosclérose, les accidents vasculaires. Du fait qu'elle est observée très tôt dans le développement de ces maladies, il s'agit d'une étape importante dans l'initiation et le développement de la pathologie.

Très souvent la dysfonction endothéliale est la conséquence d'un stress oxydant exagéré dans la paroi vasculaire entraînant une formation réduite et/ou une dégradation accrue des facteurs endothéliaux vasoprotecteurs et l'apparition de facteurs vasoconstricteurs comme des prostanoïdes vasoconstricteurs.

Il n'existe pas de traitement de la dysfonction endothéliale. Il existe seulement des traitements médicamenteux d'autres risques cardiovasculaires comme les antihypertenseurs ou les antioxydants qui améliorent certaines dysfonctions endothéliales. Leur effet est cependant limité.

[0013] Un autre objectif de l'invention est donc de proposer une solution qui permet de traiter la dysfonction endothéliale.

[0014] La norleucine est un acide aminé non protéinogène qui remplace la méthionine au cours de la synthèse des protéines. Ce remplacement de la méthionine par la norleucine est toxique : il a été démontré qu'il entraîne notamment :

- une diminution de la stabilité du cytochrome P450 : Les cytochromes P450 sont un groupe d'iso-enzymes localisées pour l'essentiel dans le réticulum endoplasmique. Ils catalysent l'oxydation de substances lipophiles endogènes (stéroïdes, acides gras, sels biliaires, prostaglandines) et exogènes (médicaments), les transformant en produits plus polaires (hydrophiles), facilitant ainsi leur élimination dans les urines. Le manque de stabilité des cytochromes P450 induit par la norleucine a pour conséquence des pathologies telles que l'empêchement d'interactions médicamenteuses primordiales aux soins, un dysfonctionnement hormonal associé au métabolisme des hormones stéroïdiennes, un dysfonctionnement de la fonction hépatique, l'apparition de cancers. Actuellement, seuls des conseils de consommation ou changement de médicaments sont utilisés pour traiter l'instabilité des cytochromes P450.

- et un manque de stimulation de la synthèse musculaire qui conduit à une perte de la masse musculaire pathologique et à des maladies associées comme l'amyotrophie, la sarcopénie, la rhabdomyolyse et la cachexie. Les traitements existants ne sont pas adaptés et aucun ne permet de cibler la synthèse de la norleucine malgré l'implication de cet acide aminé dans des voies métaboliques ubiquitaires.

- [0015] Un autre objectif de l'invention est par conséquent de proposer une solution qui permette de traiter efficacement les maladies dues à un excès de norleucine, qui soit facile à administrer et qui ne présente pas d'effets secondaires.
- [0016] Ainsi, il existe un besoin important pour un traitement d'origine naturel, qui soit efficace pour prévenir et/ou traiter efficacement de nombreuses maladies mal traitées ou non traitées jusqu'à aujourd'hui, qui soit facile à administrer et qui ne présente pas d'effets secondaires.
- [0017] C'est l'objectif de la présente invention, qui, pour y répondre, vise l'utilisation de bactéries particulières du microbiote intestinal humain, à savoir des bactéries du genre des *Massiliomicrobiota*.
- [0018] Les bactéries du genre *Massiliomicrobiota* ont été présentées en particulier dans « *Massiliomicrobiota timonensis* », a new bacterial species isolated from the human gut, S. Ndongo, S. Khelaifia, P.-E. Fournier, D. Raoult, New Microbe and New Infect 2016 ; 13 : 25-26, ou encore selon la description présentée dans « *Massiliomicrobiota escudieri* sp. nov. isolated as part of a culturomics exploration of the gut microbiota of renal cancer patients », unpublished, Tidjani Alou, M., Derosa, L. and Zitvogel, L., submitted (11-JUN-2018) U1015, Institut Gustave Roussy, 114 rue edouard vaillant, Villejuif 94800, France, Metropolitan.
- [0019] Les bactéries du genre *Massiliomicrobiota*, ont été peu étudiées. On connaît notamment *Massiliomicrobiota timonensis* et *Massiliomicrobiota escudieri*. *Massiliomicrobiota timonensis* a été décrite pour la première fois en 2016. *Massiliomicrobiota escudieri* a été décrite pour la première fois en 2018.
- Aucune utilisation thérapeutique des bactéries du genre *Massiliomicrobiota* n'a jamais été décrite ni envisagée.
- [0020] Or, de façon surprenante, et selon l'invention, les bactéries du genre *Massiliomicrobiota*, notamment *Massiliomicrobiota timonensis*, lorsqu'elles sont administrées à l'homme ou à l'animal, sont capables de traiter ou prévenir des maladies. En particulier, elles sont capables d'agir sur les marqueurs à l'origine des maladies chroniques inflammatoires, des cancers, de l'obésité, de maladies rénales et en particulier de l'insuffisance rénale, des pathologies de la dysfonction endothéliale et des maladies induites par la toxicité de la norleucine (perte de masse musculaire, maladies caractérisées par une perte de masse musculaire, maladies caractérisées par une instabilité des cytochromes P450).

[0021] C'est pourquoi, l'invention a pour objet une bactérie du genre *Massiliomicrobiota* pour son utilisation comme médicament chez l'être humain ou l'animal, en particulier pour son utilisation dans la prévention et/ou le traitement de maladies inflammatoires chroniques et/ou de cancers et/ou de l'obésité et/ou de l'insuffisance rénale et/ou de pertes musculaires pathologiques et/ou de maladies caractérisées par une perte musculaire pathologique et/ou de pathologies de la dysfonction endothéliale et/ou les maladies caractérisées par une instabilité des cytochromes P450.

[0022] Avantagement, une telle bactérie :

- lorsqu'elle est administrée à un être humain ou un animal présentant une inflammation chronique, est capable d'agir sur les molécules produites en excès lors d'une inflammation chronique comme la kynurenine, l'interleukine 6, le TNFalpha, l'interleukine 1b, les lipocalines ou la calprotectine fécale ;

- lorsqu'elle est administrée à un être humain ou un animal présentant un cancer, est capable d'agir sur les molécules produites en excès lors d'un cancer comme la putrescine ou la diméthylarginine symétrique ;

- lorsqu'elle est administrée à un être humain ou un animal obèse, est capable d'agir sur les molécules produites en excès lors d'une obésité comme la putrescine et sur les molécules produites en déficience lors d'une obésité comme la carnitine ;

- lorsqu'elle est administrée à un être humain ou un animal présentant une insuffisance rénale, est capable d'agir sur les molécules produites en excès lors d'une insuffisance rénale comme le CTGF urinaire, l'interleukine 18 du tissu rénal, la bêta-microglobuline, l'alpha1-microglobuline, la microalbumine, l'apolipoprotéine A-IV plasmatique, les cellules mononucléaires CD14 urinaires, la clustérine, la molécule-1 de l'insuffisance rénale sérique, le facteur de croissance de fibroblaste-23, la protéine liant les acides gras du foie urinaire, la glucosaminidase N-acetyl-b-O urinaire, la gélatinase neutrophile associée à la lipocaline, l'ostéopontine, la protéine 4 liant le rétinol urinaire, l'homocitrulline sérique, la diméthylarginine symétrique sérique.

- lorsqu'elle est administrée à un être humain ou un animal présentant une pathologie de la dysfonction endothéliale (hypertension, maladie oblitérante artérielle périphérique, hypercholestérolémie, pré-éclampsie, diabète mellitus, accident vasculaire, obésité, maladie de l'artère coronaire, syndrome des ovaires polykystiques, et la drépanocytose), est capable d'agir sur les molécules produites en excès lors d'une dysfonction endothéliale comme la diméthylarginine symétrique.

- lorsqu'elle est administrée à un être humain ou un animal présentant une maladie induite par une instabilité des cytochromes P450, est capable d'agir sur les molécules produites en excès lors d'une instabilité des P450 comme la norleucine,

- lorsqu'elle est administrée à un être humain ou un animal présentant une perte de masse musculaire pathologique ou une maladie associée à une perte de la masse

musculaire, est capable d'agir sur les molécules produites en excès lors d'une fonte musculaire comme la norleucine.

[0023] Pour son utilisation comme dans la prévention ou le traitement de maladies, les bactéries du genre *Massiliomicrobiota* sont préférentiellement utilisées dans des compositions. L'invention a donc également pour objet les compositions comprenant au moins une bactérie du genre *Massiliomicrobiota*, pour son utilisation comme médicament chez l'être humain ou animal, en particulier pour son utilisation dans la prévention et/ou le traitement d'au moins une maladie choisie parmi les maladies inflammatoires chroniques, les cancers, l'obésité, les maladies rénales en particulier l'insuffisance rénale, les pertes de masse musculaire pathologiques, les maladies caractérisées par une perte de masse musculaire pathologique, les maladies caractérisées par une dysfonction endothéliale, les maladies caractérisées par une instabilité des cytochromes P450 .

[0024] D'autres caractéristiques et avantages ressortiront de la description en détails de l'invention qui va suivre.

[0025] **Définitions**

Par « hyperproduction » ou « production par excès » ou « excès » d'une molécule ou substance au sens de l'invention on entend une production excessive de ladite molécule ou substance par rapport à la production de cette molécule ou substance chez une personne ou un animal sain sans pathologie.

Par « perte de masse musculaire pathologique » ou « perte de masse musculaire » ou « perte musculaire pathologique » au sens de l'invention on entend une diminution anormale, pathologique, de la masse musculaire due à une diminution de la synthèse protéique, notamment de la masse musculaire squelettique.

Par « maladie caractérisée par une perte de masse musculaire pathologique » ou « maladie caractérisée par une perte de masse musculaire » au sens de l'invention on entend une maladie dont l'un des symptômes est une perte de la masse musculaire. Il peut s'agir notamment de l'amyotrophie, la sarcopénie, de la rhabdomyolyse ou de la cachexie.

Par « maladie caractérisée par une dysfonction endothéliale » au sens de l'invention on entend une maladie dont l'une des causes est une dysfonction endothéliale c'est à dire un dysfonctionnement des cellules du tissu endothélial des vaisseaux sanguins étant à l'origine de maladies diverses. Il peut s'agir notamment de pathologies vasculaires comme l'hypertension artérielle, les dyslipidémies, les diabètes, le syndrome métabolique, l'artériosclérose, les accidents vasculaires.

Par « maladie caractérisée par une instabilité des cytochromes P450 » au sens de l'invention, on entend une maladie dont l'une des causes est une instabilité des cytochromes P450 c'est-à-dire une maladie induite par un défaut de fonctionnement des

cytochromes P450 tels qu'une dysfonction hépatique, un cancer ou un empêchement d'interactions médicamenteuses.

Par « marqueur » d'une maladie au sens de l'invention on entend une substance dont le dosage permet de suivre l'évolution de ladite maladie.

Description détaillée de l'invention

- [0026] L'invention a pour objet l'utilisation d'au moins une bactérie du genre *Massiliomicrobiota* pour prévenir et/ou traiter des maladies.
- [0027] Le genre *Massiliomicrobiota* est caractérisé selon la description présentée dans « *Massiliomicrobiota timonensis* », a new bacterial species isolated from the human gut, S. Ndong, S. Khelaifia, P.-E. Fournier, D. Raoult, *New Microbe and New Infect* 2016 ; 13 : 25-26. Et par « *Massiliomicrobiota escudieri* sp. nov. isolated as part of a culturomics exploration of the gut microbiota of renal cancer patients », unpublished, Tidjani Alou, M., Derosa, L. and Zitvogel, L., submitted (11-JUN-2018) U1015, Institut Gustave Roussy, 114 rue Edouard Vaillant, Villejuif 94800, France, Metropolitan.
- [0028] L'invention vise donc une bactérie du genre *Massiliomicrobiota* pour son utilisation comme médicament chez l'être humain ou l'animal.
- [0029] Préférentiellement l'invention vise une bactérie du genre *Massiliomicrobiota* pour son utilisation dans la prévention et/ou le traitement chez l'être humain ou l'animal d'au moins une maladie choisie parmi les maladies inflammatoires chroniques, les cancers, l'obésité, l'insuffisance rénale, la perte de masse musculaire pathologique, les maladies caractérisées par une perte de masse musculaire pathologique, les pathologies de la dysfonction endothéliale, les maladies caractérisées par une instabilité des cytochromes P450.
- [0030] Les bactéries du *Massiliomicrobiota* sont en effet utiles dans la prévention et/ou le traitement chez l'être humain ou l'animal de maladies chroniques inflammatoires, en particulier d'au moins une maladie chronique inflammatoire choisie parmi les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (telles que la colite ulcéreuse, la maladie cœliaque, la gastrite auto-immune, la maladie de Crohn, la rectocolite hémorragique) les maladies inflammatoires chroniques du foie (telles que les hépatites, la stéato-hépatite non alcoolique, la cholangite sclérosante primitive, hépatites virales chroniques, cirrhose, stéatopathie métabolique, stéatose hépatique non alcoolique), les maladies inflammatoires chroniques du pancréas (telles que la pancréatite, pancréatite aiguë), les polyarthrites (telles que la polyarthrite rhumatoïde, la polyarthrite psoriasique), les dermatites atopiques, les maladies neuro-inflammatoires (telles que les encéphalo-myélites aiguës disséminées, la sclérose en plaques, les névrites optiques, les myélites transverses, les rhombencéphalites, les encéphalites auto-immunes, les maladies systémiques avec atteinte neurologique, le syndrome d'activation macro-

phagique, le syndrome d'opsoclonus-myooclonus ou les vascularités du système nerveux central), la bronchopneumopathie chronique obstructive, le psoriasis, l'eczéma.

- [0031] Les bactéries du genre *Massiliomicrobiota* sont également utiles dans la prévention et/ou le traitement chez l'être humain ou l'animal de cancers, notamment de cancers à caractère inflammatoire, en particulier les cancers suivants : cancer du poumon, du sein, de la prostate, du côlon et du rectum, de la thyroïde, du col de l'utérus, de l'endomètre et des ovaires, de la lèvre-bouche-larynx, du rein, du foie, du cerveau, des testicules, du pancréas, des os, de la peau, du sang (leucémies), lymphomes, de l'intestin grêle, de l'estomac, de la plèvre, de l'œsophage, de la vessie
- [0032] Préférentiellement, les bactéries du genre *Massiliomicrobiota* sont utilisées selon l'invention, dans la prévention et/ou le traitement de maladies inflammatoires chroniques et/ou de cancers chez l'être humain ou l'animal chez des personnes ou des animaux présentant une maladie inflammatoire et/ou un cancer avec une hyperproductivité d'un ou plusieurs marqueurs de l'inflammation choisis parmi l'interleukine 6, la kynurenine, le TNFalpha, l'interleukine 1b, les lipocalines, la calprotectine et la putrescine.
- [0033] Selon l'invention, les bactéries du genre *Massiliomicrobiota*, lorsqu'elles sont administrées à un être humain ou un animal présentant une inflammation chronique et/ou un cancer, sont capables d'agir sur les molécules produites en excès lors d'une inflammation chronique ou d'un cancer, en particulier sur l'interleukine 6 et/ou la kynurenine et/ou le TNFalpha et/ou l'interleukine 1b et/ou les lipocalines et/ou la calprotectine et/ou la putrescine.
- [0034] L'interleukine 6 est synthétisée par les lymphocytes T, les macrophages, les fibroblastes et même les cellules musculaires en réponse à une infection, lésion, ou sécrétion d'autres cytokines et contribue à la défense de l'hôte à travers les phases aiguës de l'inflammation. La forte synthèse continue d'interleukine 6 a un effet pathologique sur l'inflammation chronique (Tanaka, T., Narazaki, M. & Kishimoto, T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6**, (2014).
- [0035] La kynurenine est un métabolite de la voie du tryptophane qui est synthétisé par l'enzyme IDO stimulée par un état inflammatoire (en présence de certaines cytokines).
- [0036] Le TNFalpha est une cytokine impliquée dans l'inflammation dont le précurseur se trouve à la surface de macrophages ou fibroblastes. Le TNFalpha est libéré par des leucocytes, des cellules endothéliales, d'autres tissus en réponse à une lésion, une infection, et il se fixe sur des récepteurs de divers organes conduisant au recrutement et à l'activation des macrophages et des lymphocytes sur le site de l'inflammation.
- [0037] L'interleukine 1b a une fonction homéostatique dans l'organisme normal et est

impliquée dans des changements pathophysiologiques aussi bien périphériques que centraux lorsqu'elle est surexprimée par les kératinocytes, les fibroblastes, les synoviocytes, les cellules endothéliales, les cellules neuronales, les cellules immunitaires telles que les macrophages, les mastocytes, les cellules gliales, les cellules microgliales et les astrocytes (Ren, K. & Torres, R. Role of interleukin-1 β during pain and inflammation. (2009). doi:10.1016/j.brainresrev.2008.12.020).

- [0038] Les lipocalines sont exprimées puis sécrétées par plusieurs cellules dont les neutrophiles par activation du facteur de transcription pro-inflammatoire NF κ B (Chassaing, B., Srinivasan, G., Delgado, M. A., Young, A. N. & Gewirtz, A. T. Fecal Lipocalin 2, a Sensitive and Broadly Dynamic Non-Invasive Biomarker for Intestinal Inflammation. *PLoS One* **7**, 44328 (2012)).
- [0039] La calprotectine est en particulier un marqueur fécal permettant de discriminer la présence de lésions des muqueuses du tube digestif d'un syndrome fonctionnel (ou hypersensibilité viscérale). C'est un dérivé des neutrophiles qui se détecte lors d'une infiltration leucocytaire de la muqueuse intestinale.
- [0040] La putrescine est une polyamine qui est un marqueur de l'inflammation dans les cellules épithéliales du colon régulant les mécanismes d'autophagie et la prolifération cellulaire et qui aussi à l'origine de carcinogénèse, en particulier du colon (Rial, N. S., Meyskens, F. L. & Gerner, E. W. Polyamines as mediators of APC-dependent intestinal carcinogenesis and cancer chemoprevention. *Essays Biochem.* **46**, 111–24 (2009)).
- [0041] Dans les maladies inflammatoires et cancers qui présentent une augmentation de l'un de ces marqueurs (interleukine 6, kynurénine, TNF α , interleukine 1b, lipocaline ou calprotectine, putrescine), leur diminution est le signe de la réduction de la voie de signal pro-inflammatoire, c'est-à-dire que les cellules immunitaires à l'origine de cette production sont moins stimulées. Dès lors, la réaction immunitaire excessive en cause de l'inflammation est ralentie et le système retourne progressivement à la norme.
- [0042] Les bactéries du *Massiliomicrobiota* sont également utiles dans la prévention et/ou le traitement chez l'être humain ou l'animal de l'obésité, en particulier l'obésité viscérale c'est-à-dire chez les obèses avec un $25 \text{ kg/m}^2 \leq \text{BMI} < 40 \text{ kg/m}^2$ et/ou un tour de taille $\geq 94 \text{ cm}$ pour les hommes ou $\geq 80 \text{ cm}$ pour les femmes.
- [0043] Préférentiellement, les bactéries du genre *Massiliomicrobiota* sont utilisées selon l'invention, dans la prévention et/ou le traitement de l'obésité chez l'être humain ou l'animal chez des personnes ou des animaux présentant une obésité avec une hyperproductivité ou une très faible productivité d'un ou plusieurs marqueurs de l'obésité suivants : putrescine (hyperproduction) et carnitine (très faible production).
- [0044] La putrescine est une polyamine qui est un marqueur de développement cellulaire, inhibant l'apoptose des cellules, comme celles des tissus adipeux et ainsi est un

marqueur de la progression du mécanisme de différenciation des pré-adipocytes en adipocytes nécessaires à au développement du tissu adipeux (Kirkwood, J. S., Miranda, C. L., Bobe, G., Maier, C. S. & Stevens, J. F. 18O-Tracer metabolomics reveals protein turnover and CDP-choline cycle activity in differentiating 3T3-L1 pre-adipocytes. *PLoS One* (2016). doi:10.1371/journal.pone.0157118).

- [0045] La carnitine est une molécule qui facilite l'oxydation des acides gras et ainsi est un marqueur de l'utilisation des acides gras comme source d'énergie, et donc associée à la réduction du tissu adipeux.
- [0046] Selon l'invention, les bactéries du genre *Massiliomicrobiota*, lorsqu'elles sont administrées à un être humain ou un animal présentant une obésité, sont capables d'agir sur les molécules produites en excès lors d'une obésité, en particulier sur la putrescine, et d'agir sur les molécules en faible quantité lors d'une obésité, en particulier la carnitine.
- [0047] Chez les obèses qui présentent une augmentation ou une réduction de l'un de ces marqueurs, leur diminution ou leur augmentation est le signe de la réduction de l'obésité, en particulier la réduction de l'adipogénèse, c'est-à-dire que les cellules pré-adipeuses à l'origine de la production de la masse grasse viscérale sont moins différenciées en cellules adipeuses constituant la formation du tissu adipeux viscéral. Dès lors, la réaction de différenciation excessive des pré-adipocytes en adipocytes en cause de l'obésité est ralentie et le système retourne progressivement à la norme.
- [0048] Les bactéries du *Massiliomicrobiota* sont également utiles dans la prévention et/ou le traitement chez l'être humain ou l'animal des maladies rénales qui sont à l'origine de la destruction irréversible des reins et menant ainsi à l'insuffisance rénale, aiguë ou chronique, en particulier de l'insuffisance rénale chronique.
- [0049] Préférentiellement, les bactéries du genre *Massiliomicrobiota* sont utilisées selon l'invention, dans la prévention et/ou le traitement de l'insuffisance rénale chez l'être humain ou l'animal chez des personnes ou des animaux présentant une insuffisance rénale avec une hyperproductivité d'un ou plusieurs marqueurs de l'insuffisance rénale suivants : le CTGF urinaire, l'interleukine 18 du tissu rénal, la bêta-microglobuline, l'alpha1-microglobuline, la microalbumine, l'apolipoprotéine A-IV plasmatique, les cellules mononucléaires CD14 urinaires, la clustérine, la molécule-1 de l'insuffisance rénale sérique, le facteur de croissance de fibroblaste-23, la protéine liant les acides gras du foie urinaire, la glucosaminidase N-acetyl-b-O urinaire, la gélatinase neutrophile associée à la lipocaline, l'ostéopontine, la protéine 4 liant le rétinol urinaire, l'homocitrulline sérique, la diméthylarginine symétrique sérique.
- [0050] Le CTGF (facteur de croissance du tissu conjonctif) urinaire est facteur profibrotique important dans les maladies rénales, dont le blocage augmente les dommages rénaux (Sánchez-López, E. *et al.* CTGF Promotes Inflammatory Cell Infiltration of the Renal Interstitium by Activating NF- κ B. *J Am Soc Nephrol* 20, 1513–1526 (2009)).

- [0051] L'interleukine 18 est un médiateur de la nécrose tubulaire aiguë ischémique et a été montré comme marqueur rapide et fiable pour la détection précoce de l'insuffisance rénale, notamment l'insuffisance rénale aiguë (Lin, X., Yuan, J., Zhao, Y. & Zha, Y. Urine interleukin-18 in prediction of acute kidney injury: a systemic review and meta-analysis. *J. Nephrol.* 28, 7–16 (2015)).
- [0052] L'alpha1-microglobuline est un marqueur de dysfonction tubulaire proximale, dès la phase précoce de lésion lorsque aucun dommage histologique est observé ; la microalbumine est un marqueur de dommages des cellules tubulaires ; la bêta - microglobuline est un marqueur excrété lors de lésions tubulaires ; la clusterine et la molécule-1 sont des marqueurs servant dans le diagnostic précoce de lésions rénales et toxicité tubulaire proximale ; les protéines liant les acides gras du foie urinaire (la L-FABP dans le tubule proximal et la H-FABP dans le tubule distal) sont des marqueurs de lésions tubulo-intersticiels ; la glucosamine N-acetyl-b-O urinaire est un marqueur sensible, persistant et robuste indiquant une lésion tubulaire ; la gélatinase neutrophile est un marqueur de l'insuffisance rénale lorsque celle-ci est liée à des conditions inflammatoires ou infectieuses ; l'ostéopontine est un marqueur surexprimé dans des biopsies rénales de patients avec hypertension Cardenas-Gonzalez, M., Pavkovic, M. & Vaidya, V. S. Biomarkers of Acute Kidney Injury. in *Comprehensive Toxicology: Third Edition* 14–15, 147–163 (Elsevier Inc., 2017)).
- [0053] L'apolipoprotéine A-IV plasmatique est un marqueur issu des entérocytes intestinales montrant la progression de la maladie (Boes, E. *et al.* Apolipoprotein A-IV Predicts Progression of Chronic Kidney Disease: The Mild to Moderate Kidney Disease Study. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17, 528–536 (2006)).
- [0054] Les cellules mononucléaires CD14 urinaires sont des marqueurs d'insuffisance rénale positivement corrélés avec le volume du rein et liés à la maladie polykystique du rein ; le facteur de croissance de fibroblaste-23 est un marqueur d'origine dans les ostéocytes ou les ostéoblastes, montrant la progression des maladies rénales et de la mortalité ; la protéine 4 liant le rétinol urinaire est un marqueur du tubule proximal dont la présence est liée à une dysfonction tubulaire proximale (Lopez-Giacoman, S. Biomarkers in chronic kidney disease, from kidney function to kidney damage. *World J. Nephrol.* 4, 57 (2015)).
- [0055] L'homocitrulline sérique est un produit dérivé de la carbamylation et est donc un marqueur de morbidité et mortalité de l'insuffisance rénale (Jaisson, S. *et al.* Homocitrulline as marker of protein carbamylation in hemodialyzed patients. *Clin. Chim. Acta* 460, 5–10 (2016)).
- [0056] La diméthylarginine symétrique sérique est un marqueur extrait de l'artère rénale montrant un dommage de l'endothélium, souvent lié à l'hypertension d'un patient souffrant d'insuffisance rénale (Fleck, C., Schweitzer, F., Karge, E., Busch, M. &

Stein, G. Serum concentrations of asymmetric (ADMA) and symmetric (SDMA) diméthylarginine in patients with chronic kidney diseases. *Clin. Chim. Acta* 336, 1–12 (2003) et Nijveldt, R. J. *et al.* Handling of asymmetrical diméthylarginine and symmetrical diméthylarginine by the rat kidney under basal conditions and during endotoxaemia. *Nephrol. Dial. Transplant.* 18, 2542–2550 (2003)).

[0057] Selon l'invention, les bactéries du genre *Massiliomicrobiota*, lorsqu'elles sont administrées à un être humain ou un animal présentant une insuffisance rénale, sont capables d'agir sur les molécules produites en excès lors d'une insuffisance rénale, en particulier sur un ou plusieurs marqueurs suivants : le CTGF urinaire, l'interleukine 18 du tissu rénal, la bêta-microglobuline, l'alpha 1-microglobuline, la microalbumine, l'apolipoprotéine A-IV plasmatique, les cellules mononucléaires CD14 urinaires, la clustérine, la molécule-1 de l'insuffisance rénale sérique, le facteur de croissance de fibroblaste-23, la protéine liant les acides gras du foie urinaire, la glucosaminidase N-acetyl-b-O urinaire, la gélatinase neutrophile associée à la lipocaline, l'ostéopontine, la protéine 4 liant le rétinol urinaire, l'homocitrulline sérique, la diméthylarginine symétrique sérique. Dans les insuffisances rénales chroniques qui présentent une augmentation d'au moins un marqueur choisi parmi : le CTGF urinaire, l'interleukine 18 du tissu rénal, la bêta-microglobuline, l'alpha 1-microglobuline, la microalbumine, l'apolipoprotéine A-IV plasmatique, les cellules mononucléaires CD14 urinaires, la clustérine, la molécule-1 de l'insuffisance rénale sérique, le facteur de croissance de fibroblaste-23, la protéine liant les acides gras du foie urinaire, la glucosaminidase N-acetyl-b-O urinaire, la gélatinase neutrophile associée à la lipocaline, l'ostéopontine, la protéine 4 liant le rétinol urinaire, l'homocitrulline sérique, la diméthylarginine symétrique sérique. Leur diminution est le signe de la réduction des voies de signal de dégradation des cellules rénales, c'est-à-dire que les cellules rénales à l'origine de cette production sont moins stimulées et que la carbamylation des protéines est moins stimulée. Dès lors, la dégradation excessive des cellules en cause de l'insuffisance rénale chronique est ralentie et le système retourne progressivement à la norme.

[0058] Les bactéries du *Massiliomicrobiota* sont également utiles dans la prévention et/ou le traitement chez l'être humain ou l'animal de la dysfonction endothéliale chez l'être humain ou l'animal, en particulier chez des personnes ou des animaux présentant une pathologie induite par une dysfonction endothéliale comme l'hypertension, la maladie oblitérante artérielle périphérique, l'hypercholestérolémie, la pré-éclampsie, le diabète mellitus, le diabète de type 2, les accidents vasculaires, la maladie de l'artère coronaire, le syndrome des ovaires polykystiques, la drépanocytose, l'arrêt cardiaque.

[0059] Préférentiellement, les bactéries du genre *Massiliomicrobiota* sont utilisées selon l'invention, dans la prévention et/ou le traitement de la dysfonction endothéliale chez l'être humain ou l'animal chez des personnes ou des animaux présentant une dys-

fonction endothéliale avec une hyperproductivité d'un ou plusieurs marqueurs de la dysfonction endothéliale suivants : insuline, adipokines, ghréline, TNF alpha, acides gras libres, protéine rétinol, inhibiteur de l'activateur plasminogène, interleukine 6, protéine réactive C, diméthylarginine symétrique.

- [0060] Selon l'invention, les bactéries du genre *Massiliomicrobiota*, lorsqu'elles sont administrées à un être humain ou un animal présentant une dysfonction endothéliale, sont capables d'agir sur les molécules produites en excès lors d'une dysfonction endothéliale, en particulier sur l'insuline, adipokines, ghréline, TNF alpha, acides gras libres, protéine rétinol, inhibiteur de l'activateur plasminogène, interleukine 6, protéine réactive C, diméthylarginine symétrique.
- [0061] Chez les personnes ou les animaux présentant une dysfonction endothéliale caractérisée par une augmentation de l'un de ces marqueurs, leur diminution est le signe de la réduction la maladie induite par la dysfonction endothéliale, c'est-à-dire que plusieurs voies métaboliques impliquées dans la dysfonction sont moins stimulées. Dès lors, les réactions métaboliques excessives en cause de la dysfonction endothéliale sont ralenties et le système retourne progressivement à la norme.
- [0062] Les bactéries du *Massiliomicrobiota* sont également utiles dans la prévention et/ou le traitement chez l'être humain ou l'animal d'au moins une maladie caractérisée par l'instabilité des cytochromes P450 chez l'être humain ou l'animal, en particulier une maladie choisie parmi l'empêchement d'interactions médicamenteuses primordiales aux soins, la dysfonction hépatique, l'apparition de cancers
- [0063] Préférentiellement les bactéries du genre *Massiliomicrobiota* sont utilisées selon l'invention, dans la prévention et/ou le traitement de maladies caractérisées par l'instabilité des cytochromes P450 chez l'être humain ou l'animal, chez des personnes ou des animaux présentant une instabilité des cytochromes P450 avec une production en excès de norleucine.
- [0064] Selon l'invention, les bactéries du genre *Massiliomicrobiota*, lorsqu'elles sont administrées à un être humain ou un animal présentant une maladie liée à l'instabilité des cytochrome P450, sont capables d'agir sur les molécules produites en excès lors d'une pathologie de l'instabilité des cytochromes P450, en particulier la norleucine.
- [0065] Chez les personnes ou les animaux présentant une instabilité des cytochromes P450 caractérisée par une augmentation de ce marqueur, sa diminution est le signe d'une bonne catalyse de l'oxydation ou la réduction des substances lipophiles endogènes (stéroïdes, acides gras, biliaires, prostaglandines) et exogènes (médicaments), les transformant en produits plus polaires (hydrophiles), facilitant ainsi leur élimination dans les urines, c'est-à-dire que les interactions médicamenteuses et les éliminations de xénobiotiques seront idéales. Dès lors, la stabilité de cytochrome P450 augmente et le système retourne progressivement à la norme. Le mécanisme physiologique

d'oxydation ou réduction de substances lipophiles se normalise et leur élimination augmente.

- [0066] Les bactéries du *Massiliomicrobiota* sont également utiles dans la prévention et/ou le traitement chez l'être humain ou l'animal d'une perte de masse musculaire pathologique et d'au moins une maladie caractérisée par une perte de masse musculaire telle que l'amyotrophie, la sarcopénie, la rhabdomyolyse et la cachexie.
- [0067] Préférentiellement les bactéries du genre *Massiliomicrobiota* sont utilisées selon l'invention, dans la prévention et/ou le traitement d'une perte de masse musculaire pathologique et d'au moins une maladie caractérisée par une perte de masse musculaire chez l'être humain ou l'animal, chez des personnes ou des animaux présentant une perte de masse musculaire pathologique ou au moins une maladie caractérisée par une perte de masse musculaire, avec une production en excès d'un ou plusieurs des marqueurs suivants : l'albumine, la pré-albumine, la protéine C réactive, la myoglobine, la norleucine.
- [0068] Selon l'invention, les bactéries du genre *Massiliomicrobiota*, lorsqu'elles sont administrées à un être humain ou un animal présentant une perte de masse musculaire pathologique ou au moins une maladie caractérisée par une amyotrophie, sont capables d'agir sur les molécules produites en excès lors d'une perte de masse musculaire pathologique ou d'une maladie caractérisée par une perte de masse musculaire pathologique, en particulier présentant un ou plusieurs marqueurs comme l'albumine, la pré-albumine, la protéine C réactive, la myoglobine, la norleucine.
- [0069] L'albumine est une protéine soluble qui est dosée pour vérifier la quantité de protéines dans le sang. Une concentration faible d'albumine est un marqueur de dénutrition qui est accompagné d'une perte importante de muscles, son augmentation est le signe d'une dénutrition qui tend à disparaître. Dès lors, la production d'albumine trop basse est contre-balançée et le système retourne progressivement à la norme. Le mécanisme physiologique de synthèse des muscles se normalise et le développement musculaire augmente.
- [0070] La protéine C réactive est une protéine qui montre l'état inflammatoire du patient qui est observé lors d'une perte musculaire due à une cachexie. Une concentration élevée de protéine C réactive est un marqueur de cachexie qui est accompagné d'une perte importante de muscles. Dès lors, la production de protéine C réactive excessive est ralentie et le système retourne progressivement à la norme. Le mécanisme physiologique de synthèse des muscles se normalise et le développement musculaire augmente.
- [0071] La myoglobine est une protéine capable de transporter l'oxygène vers les muscles, donc indispensable au travail et au développement des muscles. Une concentration élevée de myoglobine plasmatique est un marqueur d'atteinte musculaire ou rhab-

domyolyse lors de polytraumatismes, maladies infectieuses, dystrophie musculaire, myopathie. Dès lors, la production de myoglobine excessive est ralentie et le système retourne progressivement à la norme. Le mécanisme physiologique de synthèse des muscles se normalise et le développement musculaire augmente.

- [0072] Lorsque l'amyotrophie ou la maladie caractérisée par une perte de masse musculaire pathologique présente une hyperproduction de la norleucine, sa diminution est le signe de la réduction des voies de synthèse des produits secondaires des acides aminés branchés, c'est-à-dire que cette production est moins stimulée. Dès lors, la production de norleucine excessive en cause de sa toxicité est ralentie et le système retourne progressivement à la norme. Le mécanisme physiologique de synthèse des muscles se normalise et le développement musculaire augmente.
- [0073] Ainsi l'invention a pour objet particulier au moins une bactérie du genre *Massiliomicrobiota* pour son utilisation dans la prévention et/ou le traitement d'au moins une maladie choisie parmi les maladies inflammatoires chroniques, les cancers, l'obésité, les maladies rénales, les pertes de masse musculaire pathologiques, les maladies caractérisées par une amyotrophie, les maladies caractérisées par une dysfonction endothéliale, les maladies caractérisées par une instabilité des cytochromes P450.
- [0074] Les bactéries utiles selon l'invention sont administrées à des êtres humains ou des animaux dans une quantité efficace pour une action sur au moins l'un des marqueurs de la ou des pathologie(s) visée(s), c'est-à-dire pour diminuer la production d'au moins l'un de ces marqueurs dans l'organisme.
- [0075] Selon un mode de réalisation adapté, la ou les bactéries sont administrées à raison d'une dose de 10^9 à 10^{12} unités formant des colonies (CFU) par jour, quel que soit le poids de la personne ou de l'animal. Préférentiellement il s'agit d'une dose unique, c'est-à-dire administrée en une seule fois ou une dose avant chaque repas soit trois fois par jour.
- [0076] La ou les bactéries utiles selon l'invention sont des bactéries du genre *Massiliomicrobiota*. Il peut s'agir en particulier de *Massiliomicrobiota timonensis* et/ou *Massiliomicrobiota escudieri*. Selon une variante particulièrement adaptée, il s'agit de *Massiliomicrobiota timonensis*.
- [0077] Ces bactéries peuvent être isolées à partir de selles humaines par exemple selon le protocole publié par Ndongo et al. 2016 ("*Massiliomicrobiota timonensis*", a new bacterial species isolated from the human gut. Ndongo S Khelaifia S Fournier P Raoult D. New microbes and new infections, 2016 vol: 13 pp: 25-6). New Microbes and New Infections 13, 32–33 (2016)). Ce document décrit également les méthodes de culture des bactéries utiles selon l'invention.
- [0078] Les bactéries utiles selon l'invention, sont préférentiellement administrées à l'être humain ou l'animal dans une composition.

- [0079] Ainsi, l'invention a également pour objet une composition comprenant au moins une bactérie du genre *Massiliomicrobiota* pour son utilisation comme médicament chez l'être humain ou l'animal, notamment dans la prévention et/ou le traitement d'au moins une maladie choisie parmi les maladies inflammatoires chroniques, les cancers, l'obésité, l'insuffisance rénale, la perte de masse musculaire pathologique, les maladies caractérisées par une perte de masse musculaire pathologique, les pathologies de la dysfonction endothéliale, les maladies caractérisées par une instabilité des cytochromes P450.
- [0080] Les bactéries sont présentes en une quantité efficace dans la composition permettant un effet sur la ou les pathologie(s) dont sont atteints les personnes ou les animaux traités.
- [0081] Préférentiellement, la composition utile selon l'invention comprend 10^6 à 10^{12} unités formant des colonies (CFU) de bactéries du genre *Massiliomicrobiota* par dose quotidienne à administrer de composition. Préférentiellement cela correspond à une dose quotidienne de bactéries à administrer, quel que soit le poids de la personne ou de l'animal. De façon préférée, cette dose quotidienne est administrée en une seule fois.
- [0082] Préférentiellement, ces bactéries ont le gène ribosomal de la sous-unité 16S total comportant 94% de similitude avec le gène ribosomal de la sous-unité 16S de *Massiliomicrobiotatimonensis*.
- [0083] La composition utile selon l'invention peut être sous forme liquide. Elle peut notamment comprendre des bactéries du genre *Massiliomicrobiota* et un milieu de culture desdites bactéries qui permet de les conserver, comme par exemple préférentiellement le milieu Columbia agar anaérobique enrichi en sang de mouton, ou un milieu équivalent ne contenant pas de produit dérivé d'origine animale.
- [0084] Lorsque les compositions sont sous forme liquide, elles sont préférentiellement congelées, maintenues à -20°C dans un sachet hermétique.
- [0085] Selon une variante, la composition utile selon l'invention peut se présenter sous forme solide. Dans ce cas les bactéries peuvent être présentes sous forme lyophilisée, et les compositions peuvent comprendre également des excipients tels que par exemple la cellulose microcristalline, le lactose, le saccharose, le fructose, le lévulose, les amidons, le stachyose, le raffinose, l'amylum, le lactate de calcium, le sulfate de magnésium, le citrate de sodium, le calcium stearate, la polyvinylpyrrolidone, la maltodextrine, les galactooligosaccharides, les fructooligosaccharides, les pectines, les bêta-glucans, les lactoglobulines, les isomaltooligosaccharides, les polydextroses, le sorbitol et/ou le glycérol.
- [0086] Les compositions utiles selon l'invention peuvent se présenter en particulier sous forme de poudre, de poudre microencapsulée, de gélule, de capsule, de comprimé, de pastille, de granulés, d'émulsion, de suspension ou de suppositoire. Selon un mode de

réalisation particulièrement adapté, elles peuvent se présenter sous une forme gastro-résistante, telles qu'un comprimé enrobé contenant des bactéries microencapsulées.

[0087] Lorsque les compositions sont sous forme solide, elles sont préférentiellement conditionnées dans des capsules ou dans un enrobage hermétique à la lumière et à l'oxygène maintenu à une température ambiante comprise entre 15°C et 40°C et un taux d'humidité compris entre 3% et 70%.

[0088] Les bactéries peuvent être utilisées vivantes ou inactivées par exemple par la chaleur, l'exposition à un pH approprié, aux rayons gamma ou à la mise sous haute pression. Elles peuvent être toutes vivantes ou toutes inactivées.

Préférentiellement, au moins une partie des bactéries est constituée par des bactéries vivantes, en particulier au moins 50% (en nombre), encore plus préférentiellement au moins 90% (en nombre).

[0089] Ainsi, selon un mode de réalisation adapté, les bactéries présentes dans la composition utile selon l'invention sont pour au moins 50% des bactéries vivantes (en nombre), préférentiellement pour au moins 90% des bactéries vivantes (en nombre), encore plus préférentiellement toutes vivantes.

[0090] Les bactéries utiles selon l'invention, et en particulier les compositions l'incluant, peuvent être administrées par voie orale, topique, respiratoire (inhalation) ou rectale.

[0091] Les compositions utiles selon l'invention, en plus des bactéries utiles selon l'invention peuvent comprendre d'autres composés, tels que :

- au moins un probiotique, et/ou
- au moins une bactérie permettant de créer un environnement anaérobie favorable aux bactéries du genre *Massiliomicrobiota* telle qu'au moins une bactérie choisie parmi les bactéries du genre *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Streptococcus spp.* et/ou au moins un autre organisme favorisant les conditions anaérobies nécessaires à la survie des *Massiliomicrobiota* telle qu'au moins une levure choisie parmi des *Saccharomyces spp.* ou des micro-organismes de la famille des *Methanobacteriaceae* et/ou
 - au moins une bactérie associée à l'écosystème des bactéries du genre *Massiliomicrobiota* car elles facilitent leur survie dans l'intestin telle qu'au moins une bactérie choisie parmi les bactéries du phylum Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Terrificutes, et Verrucomicrobia, et/ou
 - au moins une bactérie choisie parmi les bactéries de l'ordre des *Clostridiales*, des *Verrucomicrobiales*, des *Aeromonadales*, des *Alteromonadales*, ML615J-28, RF32, YS2, de la famille des *Clostridiacées*, des *Christensenellacées* des *Lachnospiracées*, des *Ruminococcacées*, des *Bacteroidacées*, des *Enterococcacées*, des *Rikenellacées*, des *Dehalobactériacées*, des *Veillonellacées*, des *Lactobacillacées* et/ou
 - au moins une bactérie choisie parmi les bactéries du genre *Faecalibacterium*, *Chris-*

tensenella, *Akkermansia*, *Eubacterium* et *Oscillospira* telle que par exemple *Faecalibacterium prausnitzii*, *Christensenella minuta*, *Akkermansia muciniphila*, *Eubacterium halii*, *Oscillospira guilliermondii*, et/ou

- au moins un prébiotique tel que par exemple au moins un prébiotique choisi parmi les galactooligosaccharides, les fructooligosaccharides, les inulines, les arabinoxylans, les béta-glucanes, les lactoglobulines et/ou les béta-caséines, et/ou

- au moins un polyphénol tel que par exemple au moins un polyphénol choisi parmi la quercétin, le kaempferol, le resvératrol, les flavones (comme la lutéoline), les flavan-3-ols (comme les catéchines), les flavanones (comme la narinénine), les isoflavones, les anthocyanidines, les proanthocyanidines, et/ou

- au moins un minéral et/ou au moins une vitamine et/ou au moins un agent nutritionnel, et/ou

- au moins un principe actif pharmaceutique, préférentiellement au moins un principe actif présentant un effet thérapeutique sur la ou les pathologies pour la ou laquelle(s) les bactéries du genre *Massiliomicrobiota* sont utilisées, tel que par exemple :

* les anti-inflammatoires non stéroïdiens, les anticorps dirigés contre des cibles pro-inflammatoires (anti-TNFalpha), les antirhumatismaux, les analgésiques, les antimicrobiens, les corticostéroïdes, les anaboliques stéroïdiens, les antidiabétiques, les agents thyroïdiens, les antidiarrhéiques, les antitussifs, les antiémétiques, les anti ulcères, les laxatifs, les anticoagulants, l'érythropoïétine, les immunoglobulines, les immunosuppresseurs, les hormones de croissance, les médicaments hormonaux, les modulateurs des récepteurs aux œstrogènes, les agents alkylant, les antimétabolites, les inhibiteurs mitotiques, les radiopharmaceutiques, les anti-dépresseurs, les antipsychotiques, les anxiolytiques, les hypnotiques, les sympathomimétiques, les stimulants, le donepezil, la tacrine, les médicaments pour l'asthme, les bêta-agonistes, les stéroïdes inhalés, les inhibiteurs de leucotriène, les cromoglycates ou acides cromoglycidiques, l'épinéphrine, la dornase alpha, les cytokines, les antagonistes de cytokines ;

* les médicaments de chimiothérapies dont les thérapies ciblées ou biothérapies, l'hormonothérapie ou l'immunothérapie

* les médicaments contre l'obésité, par exemple l'orlistat, le fucus complexe, l'oligosol zinc-nickel-cobalt, l'arkogélule maté, l'arkogélules orthosiphon, l'élusane prêle, le médiflor n°1, le santane ;

* les médicaments de l'insuffisance rénale, la vitamine D, le sévélamer, le sulfonate de polystyrène, le calcium, les calcimétiques cinacalcet, la darbopoiétine, l'érythropoïétine, la furosémide, l'hydrochlorothiazide dans le cas d'une rhabdomyolyse ;

* les médicaments de la perte de masse musculaire pathologique, des inhibiteurs

d'autophagie dans le cas de la cachexie, le nusinersen, la flunarizine, la riluzole, dans le cas de l'amyotrophie ;

* les antihypertenseurs tels que les diurétiques, les diurétiques de l'anse de Henle les diurétiques en association, les bêtabloquants utiles dans le traitement de l'hypertension artérielle, les inhibiteurs calciques, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion, les antagonistes de l'angiotensine II, et des associations de ces antihypertenseurs (antagoniste de l'angiotensine II + diurétique, antagoniste de l'angiotensine II + inhibiteur calcique, bêtabloquant + diurétique, bêtabloquant + inhibiteur calcique, diurétique + réserpine, inhibiteur de l'enzyme de conversion + diurétique, inhibiteur de l'enzyme de conversion + inhibiteur calcique, diurétiques + inhibiteurs calciques), les inhibiteurs d'action centrale, les alphabloquants, les vasodilatateurs ;

* les antioxydants comme la vitamine C, la vitamine D, la vitamine E, l'acide folique, le bêta-carotène, le cuivre, le zinc, le fer, le sélénium, le manganèse, le coenzyme Q10 ;

* les hypolipémiantes (ou hypocholestérolémiantes) comme les fibrates, les statines, la cholestyramine, l'ézétimibe ; seuls ou associés ;

* les antiagrégants plaquettaires comme l'aspirine, le clopidrogel ;

* les médicaments contre les maladies de l'artère coronaire comme les nitrites, la morphine, la ranolazine, les bêta-bloquants et inhibiteurs calciques,

* les médicaments antiplaquettaires comme l'acide acétylsalicylique (aspirine), le clopidrogel, le prasugrel, le ticagrelor

* les médicaments thrombolytiques comme l'altéplase, l'anistréplase, la rétéplase, la streptokinase, la ténecteplase.

[0092] L'invention est à présent illustrée par des exemples de bactéries utiles selon l'invention, de procédés de cultures de ces bactéries, des exemples de compositions les contenant et des résultats d'essais démontrant l'efficacité des bactéries du genre *Massiliomicrobiota* sur différentes pathologies.

Exemples

[0093] Exemple 1 : *Massiliomicrobiota timonensis*

Massiliomicrobiota peut être cultivée selon le protocole opératoire décrit en suivant :

- milieu agar Columbia (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) enrichi à 5% de sang de mouton Columbia agar

- à 37°C

- atmosphère anaérobie générée par AnaeroGen (bioMérieux).

- 72 heures d'incubation.

[0094] Exemple 2 : *Massiliomicrobiota escudieri*

Massiliomicrobiota peut être cultivée selon le protocole opératoire décrit en suivant :

- milieu agar Columbia (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) enrichi à 5% de sang de

mouton Columbia agar

- à 37°C

- atmosphère anaérobie générée par AnaeroGen (bioMérieux).

- 72 heures d'incubation

[0095] Exemple 3 : Composition utile selon l'invention sous forme liquide

[0096] Un exemple de composition utile selon l'invention sous forme liquide est une composition comprenant *Massiliomicrobiota timonensis* 10⁹ CFU/mL dans le milieu de culture RCM anaérobie décrit ci-dessus modifié pour ne contenir aucun produit d'origine animale et enrichi en glycérol 5%.

[0097] La composition de l'exemple 3 est obtenue à partir d'une RCB («research cell bank » banque de cellules de recherche) préparée à base de *Massiliomicrobiota timonensis* 10¹⁰ CFU/ mL puis conservée congelée à -20°C dans un sachet hermétique à l'oxygène.

[0098] La composition congelée doit être réchauffée à température ambiante jusqu'à retrouver une forme liquide avant utilisation.

[0099] Exemple 4 : Composition utile selon l'invention sous forme solide

[0100] Un exemple de composition utile selon l'invention sous forme lyophilisée peut être obtenu par lyophilisation de la composition de l'exemple 3 à l'état congelé.

[0101] **Essais démontrant l'efficacité de l'invention dans la prévention et le traitement de différentes pathologies**

[0102] Démonstration de l'effet anti-inflammatoire *in vitro*

[0103] L'objectif de cette étude est de démontrer l'effet anti-inflammatoire *in vitro* de bactéries selon l'invention. La démonstration a été réalisée sur un des marqueurs de l'inflammation : la kynurénine.

En effet, La kynurénine est un marqueur de l'inflammation, elle favorise l'immunosuppression en réponse à une inflammation ou à une infection en réduisant l'activité des cellules tueuses naturelles, des cellules dendritiques ou des cellules T en prolifération.

[0104] Le protocole opératoire de l'étude est décrit en suivant.

[0105] 1/ Protocole de fermentation à partir de fèces d'origine humaine contenant du *Massiliomicrobiota spp.* :

- Les donneurs ne devaient pas avoir pris d'antibiotiques durant les six mois précédents l'expérience et n'avoir aucun historique de désordres gastro-intestinaux. Les donneurs étaient âgés entre 18 et 60 ans.

- La collecte des échantillons frais de leur fèces est obtenue dans des contenants stériles en plastique, conservés dans des flacons anaérobies contenant un sachet de 2,5l d'AnaeroGenTM d'OxoidTM (O₂ <0.1%; CO₂: 7-15%). Ces échantillons ont été apportés au laboratoire dans les deux heures après leur production.

- Les échantillons de fèces ont été dilués au 1/5 (poids/volumes) dans une solution

saline tamponnée au phosphate (1M) (PBS), pH 7,4. La suspension a été homogénéisée dans un stomacher pendant 120 secondes.

- Milieu nutritif de base: le milieu nutritif de base a été préparé à partir de 2g/L de bouillon de tryptone de soja, 2g/L d'extrait de levure, 0,1g/L de NaCl, 0,04g/L de K₂HPO₄, 0,01g/L de MgSO₃.7H₂O, 0,01g/L de CaCl₂.6H₂O, 2g/L NaHCO₃, 0,5g/L de L-cystine HCl, 2mL/L de tween 80, 10µL/L de vitamine K1, 0,05g/L d'hème, 0,05g/L de sels biliaires, 4ml/L de résazarin (pH7)

- Fermentation en biofermenteur : Les biofermenteurs de 20mL de contenance contenaient 18mL de milieu nutritif de base autoclavé (121°C pendant 15 minutes) et versé aseptiquement dans les biofermenteurs stériles. Ce système a été laissé au repos toute la nuit avec un bullage d'azote sans oxygène à travers le milieu à un taux de 2mL/min. Le pH était maintenu entre 6,7 et 6,9 en utilisant du HCl ou NaOH (0,5M). La température de chaque biofermenteur était contrôlée à 37°C et le contenu du récipient homogénéisé avec un mélangeur magnétique

- un mélange de protéines prédigérées (0,35g) a été ajouté dans les récipients avant l'inoculation avec 2mL d'inocula fécal à T0. Les protéines prédigérées ont été obtenues selon le protocole de digestion gastro-intestinale adapté de celui de Versantvoort et al (2005).

- les échantillons ont été collectés avant la fermentation (T0) et après 48 heures de fermentation (T48), et congelés à -80°C jusqu'aux analyses.

[0106] 2/ Quantification de la kynurenine

- 50 µL d'échantillons collectés et conservés à -80°C ont été mélangés avec 20 µL d'eau Milli-Q contenant des standards internes.

- Le mélange a été mélangé et filtré à travers un filtre de seuil 5-kDa pour retirer les macromolécules.

- Les métabolites ont été détectés par analyses en électrophorèse capillaire- spectrométrie de masse à temps de vol (CE-TOFMS). La limite de détection des pics a été déterminée sur la base du ratio signal/bruit, S/N=3.

Aire relative du pic = (aire du pic d'un métabolite)/(aire du pic du standard interne x quantité d'échantillon).

[0107] 3/ Quantification de *Massiliomicrobiota spp.*

- L'ADN contenu dans les échantillons a été extrait en utilisant le kit NucleoSpin®96 Soil de Macherey-Nagel selon les instructions du fabricant.

- L'ADN extrait total a ensuite été fragmenté aléatoirement en fragments de 350 bp puis utilisé pour construire une librairie en utilisant le kit NEBNext Ultra II par New England Biolabs selon les instructions du fabricant.

- La librairie a ensuite été séquencée en utilisant du séquençage paired-end de 2 x 150 bp sur une plateforme Illumina HiSeq.

- L'abondance des bactéries a été mesurée en créant un catalogue d'espèces métagénomiques (MGS) à partir d'un catalogue de référence contenant 22M de gènes. Ces MGS ont ensuite été associées à un niveau taxonomique adapté. Dans le cas des *Massiliomicrobiota*, celles-ci ont été détectées au niveau du genre et sont donc référencées dans cette expérience par *Massiliomicrobiota spp.*

La quantité relative de kynurénine et l'abondance relative de *Massiliomicrobiotaspp.* ont été analysées et corrélées, obtenant une régression linéaire de $R=-0,44$ ($n=18$). Les résultats sont présentés dans le Tableau 1.

[0108] [Tableaux1]

Echantillons	Abondance relative de <i>Massiliomicrobiotaspp</i> ($\times 10^{-3}$)	Quantité relative de Kynurenine ($\times 10^{-5}$)
V1	0	0
V2	4,14	0
V3	1,23	0
V4	0	3,46
V5	0	3,67
V6	0	0
V7	1,29	8,18
V8	1,19	4,58
V9	1,23	0
V10	0	13,00
V11	0	14,19
V12	0	8,36
V13	5,84	0
V14	4,31	2,87
V15	4,08	0
V16	0	5,30
V17	0	4,76
V18	0	2,92

[0109] On constate une corrélation négative entre les bactéries du genre *Massiliomicrobiota* et la kynurénine, ce qui démontre un effet protecteur des bactéries du genre *Massiliomicrobiota* contre l'inflammation chronique.

[0110] Ainsi les bactéries du genre *Massiliomicrobiota* sont capables d'agir en diminuant la

production de marqueurs de l'inflammation chronique, notamment de kynurénine. Elles peuvent donc être utilisées pour prévenir et/ou traiter l'inflammation chronique et les maladies inflammatoires chroniques.

[0111] Démonstration de l'effet anti-obésité *in vitro*

L'objectif de cette étude est de démontrer l'effet anti-obésité *in vitro* de bactéries selon l'invention. La démonstration a été réalisée sur un des marqueurs de l'adipogénèse : la putrescine, et un des marqueurs de la lipolyse : la carnitine.

En effet, la putrescine est synthétisée à partir d'arginine et est plus élevée en cas d'obésité avec un rôle dans le stade précoce de l'adipogénèse comme les autres polyamines.

La carnitine a été associée à une perte de poids. Les niveaux cellulaires élevés de carnitine facilitent l'entrée des acides gras libres dans les mitochondries où ils sont dégradés pour produire de l'énergie entraînant une perte de poids et en particulier une perte de masse grasse.

[0112] Le protocole opératoire de l'étude est décrit en suivant.

[0113] 1/ Protocole de fermentation à partir de fèces d'origine humaine contenant du *Massiliomicrobiotaspp* . :

Le protocole de fermentation est identique à celui présenté pour l'étude réalisée sur la kynurénine.

[0114] 2/ Quantification de la putrescine et de la carnitine

- 50 µL d'échantillons collectés et conservés à -80°C ont été mélangés avec 20 µL d'eau Milli-Q contenant des standards internes.

- Le mélange a été mélangé et filtré à travers un filtre de seuil 5-kDa pour retirer les macromolécules.

- Les métabolites ont été détectés par analyses en électrophorèse capillaire- spectrométrie de masse à temps de vol (CE-TOFMS). La limite de détection des pics a été déterminée sur la base du ratio signal/bruit, S/N=3.

Aire relative du pic = (aire du pic d'un métabolite)/(aire du pic du standard interne x quantité d'échantillon).

[0115] 3/ Quantification de *Massiliomicrobiota spp*.

Le procédé de quantification de *Massiliomicrobiota spp* est identique à celui présenté pour l'étude réalisée sur la kynurénine.

[0116] La quantité relative de putrescine et carnitine et l'abondance relative de *Massiliomicrobiota spp*. ont été analysées et corrélées, obtenant une régression linéaire de R=-0,26 et R=0,25 respectivement (n=18). Les résultats sont présentés dans le Tableau 2.

[0117]

[Tableaux2]

Echantillon	Abondance relative de <i>Massiliomicrobiota spp</i> (x10 ⁻³)	Quantité relative de Putrescine (x10 ⁻⁵)	Quantité relative de Carnitine (x10 ⁻⁵)
V1	0	8,81	2,73
V2	4,14	16,87	5,85
V3	1,23	3,81	3,94
V4	0	30,78	3,70
V5	0	15,97	4,62
V6	0	4,48	3,85
V7	1,29	7210,69	0
V8	1,19	9129,30	0
V9	1,23	7301,26	0
V10	0	11553,02	0
V11	0	9383,26	0
V12	0	13224,78	0
V13	5,84	3355,24	6,71
V14	4,31	4339,57	8,67
V15	4,08	2,96	7,41
V16	0	3884,40	0
V17	0	5560,86	0
V18	0	6564,97	22,46

[0118] On constate une corrélation négative entre les bactéries du genre *Massiliomicrobiota* et la putrescine et la carnitine, ce qui démontre un effet protecteur des bactéries du genre *Massiliomicrobiota* contre l'obésité.

[0119] Ainsi les bactéries du genre *Massiliomicrobiota* sont capables d'agir en diminuant la production de marqueurs de l'obésité, notamment de putrescine et carnitine. Elles peuvent donc être utilisées pour prévenir et/ou traiter l'obésité.

[0120] Démonstration de l'effet anti-cancer *in vitro*

[0121] L'objectif de cette étude est de démontrer l'effet anti-cancer *in vitro* de bactéries selon l'invention. La démonstration a été réalisée sur un des marqueurs de toxicité : la putrescine et la diméthylarginine symétrique.

En effet, la putrescine est connue pour son implication dans le cancer colorectal, le

cancer de la prostate et d'autres cancers.

La diméthylarginine symétrique résulte de la méthylation de l'arginine par la protéine arginine méthyltransférases (PRTMTs II) dont la surexpression est associée à différents cancers (Yang, Y. & Bedford, M. T. Protein arginine methyltransferases and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 13, 37–50 (2013)).

[0122] Le protocole opératoire de l'étude est décrit en suivant.

[0123] 1/ Protocole de fermentation à partir de fèces d'origine humaine contenant du *Massiliomicrobiotaspp* . :

Le protocole de fermentation est identique à celui présenté pour l'étude réalisée sur la kynurénine.

[0124] 2/ Quantification de la norleucine et de la diméthylarginine symétrique

- 50 µL d'échantillons collectés et conservés à -80°C ont été mélangés avec 20 µL d'eau Milli-Q contenant des standards internes.

- Le mélange a été mélangé et filtré à travers un filtre de seuil 5-kDa pour retirer les macromolécules.

- Les métabolites ont été détectés par analyses en électrophorèse capillaire- spectrométrie de masse à temps de vol (CE-TOFMS). La limite de détection des pics a été déterminée sur la base du ratio signal/bruit, S/N=3.

Aire relative du pic = (aire du pic d'un métabolite)/(aire du pic du standard interne x quantité d'échantillon).

[0125] 3/ Quantification de *Massiliomicrobiota spp*.

[0126] Le procédé de quantification de *Massiliomicrobiota spp* est identique à celui présenté pour l'étude réalisée sur la kynurénine.

[0127] La quantité relative de putrescine et l'abondance relative de *Massiliomicrobiotaspp*. ont été analysées et corrélées, obtenant une régression linéaire de R=-0,44 (n=18). Les résultats sont présentés dans le Tableau 3.

[0128]

[Tableaux3]

Echantillon s	Abondance relative de <i>Massiliomicrobiota spp</i> ($\times 10^{-3}$)	Quantité relative de Putrescine ($\times 10^{-5}$)	Quantité relative de diméthylarginine symétrique ($\times 10^{-5}$)
V1	0	8,81	0
V2	4,14	16,87	0
V3	1,23	3,81	0
V4	0	30,78	0
V5	0	15,97	0
V6	0	4,48	0
V7	1,29	7210,69	3,78
V8	1,19	9129,30	4,21
V9	1,23	7301,26	0
V10	0	11553,02	5,10
V11	0	9383,26	5,92
V12	0	13224,78	4,61
V13	5,84	3355,24	0
V14	4,31	4339,57	0
V15	4,08	2,96	0
V16	0	3884,40	0
V17	0	5560,86	0
V18	0	6564,97	0

[0129] On constate une corrélation négative entre les bactéries du genre *Massiliomicrobiota* et la putrescine et la diméthylarginine symétrique, ce qui démontre un effet protecteur des bactéries du genre *Massiliomicrobiota* contre les cancers.

[0130] Ainsi les bactéries du genre *Massiliomicrobiota* sont capables d'agir en diminuant la production de marqueurs de cancers, notamment de putrescine et diméthylarginine symétrique. Elles peuvent donc être utilisées pour prévenir et/ou traiter les cancers.

[0131] Démonstration de l'effet contre l'insuffisance rénale *in vitro*

[0132] L'objectif de cette étude est de démontrer l'effet sur l'insuffisance rénale *in vitro* de bactéries selon l'invention. La démonstration a été réalisée sur un des marqueurs de l'insuffisance rénale aigüe : la diméthylarginine symétrique et l'homocitrulline.

La diméthylarginine symétrique présente une corrélation positive avec la fonction

rénale pathologique (marqueur de l'atteinte rénale aiguë).

La carbamylation est une modification post-traductionnelle non enzymatique de protéines qui est caractérisée par la liaison de l'acide isocyanique à des groupes amino de protéines (α -NH₂ ou ϵ -NH₂). Cette réaction entraîne la formation de produits dérivés de la carbamylation (CDP), le plus représentatif étant l'homocitrulline (HCit), qui est générée par la liaison de l'acide isocyanique au groupe ϵ -NH₂ de la chaîne latérale des résidus de lysine.

L'homocitrulline est un produit dérivé de la carbamylation qui a été identifié comme un marqueur majeur de la morbidité et de la mortalité chez les patients atteints d'insuffisance rénale chronique.

[0133] Le protocole opératoire de l'étude est décrit en suivant.

[0134] 1/ Protocole de fermentation à partir de fèces d'origine humaine contenant du *Massiliomicrobiotaspp* . :

Le protocole de fermentation est identique à celui présenté pour l'étude réalisée sur la kynurénine.

[0135] 2/ Quantification de la diméthylarginine symétrique et l'homocitrulline

- 50 μ L d'échantillons collectés et conservés à -80°C ont été mélangés avec 20 μ L d'eau Milli-Q contenant des standards internes.

- Le mélange a été mélangé et filtré à travers un filtre de seuil 5-kDa pour retirer les macromolécules.

- Les métabolites ont été détectés par analyses en électrophorèse capillaire- spectrométrie de masse à temps de vol (CE-TOFMS). La limite de détection des pics a été déterminée sur la base du ratio signal/bruit, S/N=3.

Aire relative du pic = (aire du pic d'un métabolite)/(aire du pic du standard interne x quantité d'échantillon).

[0136] 3/ Quantification de *Massiliomicrobiotaspp*.

[0137] Le procédé de quantification de *Massiliomicrobiota spp* est identique à celui présenté pour l'étude réalisée sur la kynurénine.

[0138] La quantité relative de diméthylarginine symétrique, de diméthylarginine asymétrique et l'abondance relative de *Massiliomicrobiotaspp*. ont été analysées et corrélées, obtenant une régression linéaire de R=-0,29 et R=-0,4 respectivement (n=18). Les résultats sont présentés dans le Tableau 4.

[0139]

[Tableaux4]

Echantillon	Abondance relative de <i>Massiliomicrobiota spp</i> ($\times 10^{-3}$)	Quantité relative de diméthylarginine symétrique ($\times 10^{-5}$)	Quantité relative de homocitrulline ($\times 10^{-5}$)
V1	0	0	2,87
V2	4,14	0	0
V3	1,23	0	4,18
V4	0	0	3,50
V5	0	0	2,92
V6	0	0	3,47
V7	1,29	3,78	4,34
V8	1,19	4,21	18,82
V9	1,23	0	0
V10	0	5,10	39,15
V11	0	5,92	19,14
V12	0	4,61	14,81
V13	5,84	0	0
V14	4,31	0	6,14
V15	4,08	0	0
V16	0	0	7,56
V17	0	0	11,77
V18	0	0	7,68

[0140] On constate une corrélation négative entre les bactéries du genre *Massiliomicrobiota* et l'homocitrulline et la diméthylarginine symétrique sérique, ce qui démontre un effet protecteur des bactéries du genre *Massiliomicrobiota* contre l'insuffisance rénale.

[0141] Ainsi les bactéries du genre *Massiliomicrobiota* sont capables d'agir en diminuant la production de marqueurs de l'insuffisance rénale, notamment d'homocitrulline et de diméthylarginine symétrique sérique. Elles peuvent donc être utilisées pour prévenir et/ou traiter l'insuffisance rénale chronique.

[0142] Démonstration de l'effet contre les pathologies de dysfonction endothéliale *in vitro*

[0143] L'objectif de cette étude est de démontrer l'effet contre les pathologies de dys-

fonction endothéliale in vitro de bactéries selon l'invention. La démonstration a été réalisée sur un des marqueurs de la dysfonction endothéliale : la diméthylarginine symétrique.

La diméthylarginine symétrique présente une corrélation positive avec le dysfonctionnement endothélial (hypertension, maladie artérielle occlusive périphérique, hypercholestérolémie, prééclampsie, diabète sucré, accident vasculaire cérébral, obésité, maladie coronarienne, syndrome coronarien, syndrome de l'ovaire polykystique).

[0144] Le protocole opératoire de l'étude est décrit en suivant.

[0145] 1/ Protocole de fermentation à partir de fèces d'origine humaine contenant du *Massiliomicrobiota spp* . :

Le protocole de fermentation est identique à celui présenté pour l'étude réalisée sur la kynurénine.

[0146] 2/ Quantification de la diméthylarginine symétrique

- 50 µL d'échantillons collectés et conservés à -80°C ont été mélangés avec 20 µL d'eau Milli-Q contenant des standards internes.

- Le mélange a été mélangé et filtré à travers un filtre de seuil 5-kDa pour retirer les macromolécules.

- Les métabolites ont été détectés par analyses en électrophorèse capillaire- spectrométrie de masse à temps de vol (CE-TOFMS). La limite de détection des pics a été déterminée sur la base du ratio signal/bruit, S/N=3.

Aire relative du pic = (aire du pic d'un métabolite)/(aire du pic du standard interne x quantité d'échantillon).

[0147] 3/ Quantification de *Massiliomicrobiota spp*.

Le procédé de quantification de *Massiliomicrobiota spp* est identique à celui présenté pour l'étude réalisée sur la kynurénine.

[0148] La quantité relative de diméthylarginine symétrique et l'abondance relative de *Massiliomicrobiotaspp*. ont été analysées et corrélées, obtenant une régression linéaire de R=-0,29 (n=18). Les résultats sont présentés dans le Tableau 5.

[0149]

[Tableaux5]

Echantillons	Abondance relative de <i>Massiliomicrobiota spp</i> ($\times 10^{-3}$)	Quantité relative de diméthyl-arginine symétrique ($\times 10^{-5}$)
V1	0	0
V2	4,14	0
V3	1,23	0
V4	0	0
V5	0	0
V6	0	0
V7	1,29	3,78
V8	1,19	4,21
V9	1,23	0
V10	0	5,10
V11	0	5,92
V12	0	4,61
V13	5,84	0
V14	4,31	0
V15	4,08	0
V16	0	0
V17	0	0
V18	0	0

[0150] On constate une corrélation négative entre les bactéries du genre *Massiliomicrobiota* et la diméthylarginine symétrique, ce qui démontre un effet protecteur des bactéries du genre *Massiliomicrobiota* contre la dysfonction endothéliale.

[0151] Ainsi les bactéries du genre *Massiliomicrobiota* sont capables d'agir en diminuant la production de marqueurs de la dysfonction endothéliale, notamment de diméthyl-arginine symétrique. Elles peuvent donc être utilisées pour prévenir et/ou traiter la dysfonction endothéliale.

[0152] Démonstration *in vitro* de la lutte contre l'instabilité des cytochromes P450 et des maladies caractérisées par une instabilité des cytochromes P450 et contre une perte de masse musculaire pathologique et les maladies caractérisées par une perte de masse musculaire pathologique

[0153] L'objectif de cette étude est de démontrer l'effet sur la lutte contre l'instabilité des

cytochromes P450 d'une part et contre la perte de la masse musculaire d'autre part, in vitro, de bactéries selon l'invention. La démonstration a été réalisée sur un des marqueurs communs à ces deux pathologies : la norleucine.

[0154] Le protocole opératoire de l'étude est décrit en suivant.

1/ Protocole de fermentation à partir de fèces d'origine humaine contenant du *Massiliomicrobiota spp* . :

Le protocole de fermentation est identique à celui présenté pour l'étude réalisée sur la kynurénine.

[0155] 2/ Quantification de la norleucine

- 50 µL d'échantillons collectés et conservés à -80°C ont été mélangés avec 20 µL d'eau Milli-Q contenant des standards internes.

- Le mélange a été mélangé et filtré à travers un filtre de seuil 5-kDa pour retirer les macromolécules.

- Les métabolites ont été détectés par analyses en électrophorèse capillaire- spectrométrie de masse à temps de vol (CE-TOFMS). La limite de détection des pics a été déterminée sur la base du ratio signal/bruit, S/N=3.

Aire relative du pic = (aire du pic d'un métabolite)/(aire du pic du standard interne x quantité d'échantillon).

[0156] 3/ Quantification de *Massiliomicrobiotaspp*.

Le procédé de quantification de *Massiliomicrobiota spp* est identique à celui présenté pour l'étude réalisée sur la kynurénine.

[0157] La quantité relative de norleucine et l'abondance relative de *Massiliomicrobiotaspp*. ont été analysées et corrélées, obtenant une régression linéaire de R=-0,44 (n=18). Les résultats sont présentés dans le Tableau 6.

[0158]

[Tableaux6]

Echantillons	Abondance relative de <i>Massiliomicrobiota spp</i> ($\times 10^{-3}$)	Quantité relative de Norleucine ($\times 10^{-3}$)
V1	0	0
V2	4,14	0
V3	1,23	0
V4	0	19,98
V5	0	5,75
V6	0	23,23
V7	1,29	5,27
V8	1,19	0
V9	1,23	0
V10	0	13,09
V11	0	7,71
V12	0	21,90
V13	5,84	0
V14	4,31	1,47
V15	4,08	0
V16	0	17,22
V17	0	8,66
V18	0	22,62

[0159] On constate une corrélation négative entre les bactéries du genre *Massiliomicrobiota* et la norleucine, ce qui démontre un effet protecteur des bactéries du genre *Massiliomicrobiota* contre la perte de masse musculaire et/ou l'instabilité des cytochromes P450.

[0160] Ainsi les bactéries du genre *Massiliomicrobiota* sont capables d'agir en diminuant la production de marqueurs d'une perte de masse musculaire pathologique et/ou d'une instabilité des cytochromes P450, notamment de norleucine. Elles peuvent donc être utilisées pour prévenir et/ou traiter une perte de masse musculaire pathologique et/ou une maladie caractérisée par une perte de masse musculaire pathologique et/ou une instabilité des cytochromes P450 et/ou une maladie caractérisée par une instabilité des cytochromes P450.

Revendications

- [Revendication 1] Bactérie du genre *Massiliomicrobiota* pour son utilisation comme médicament chez l'être humain ou l'animal.
- [Revendication 2] Bactérie du genre *Massiliomicrobiota* pour son utilisation selon la revendication 1 dans la prévention et/ou le traitement d'au moins une maladie choisie parmi les maladies inflammatoires chroniques, les cancers, l'obésité, les maladies rénales, la perte de masse musculaire pathologique, les maladies caractérisées par une perte de masse musculaire pathologique, les maladies caractérisées par une dysfonction endothéliale, les maladies caractérisées par une instabilité des cytochromes P450 chez l'être humain ou l'animal.
- [Revendication 3] Bactérie du genre *Massiliomicrobiota* pour son utilisation selon l'une des précédentes revendications, dans la prévention et/ou le traitement d'au moins une maladie choisie parmi les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, les maladies inflammatoires chroniques du foie, les maladies inflammatoires chroniques du pancréas, les polyarthrites, les dermatites atopiques, les maladies neuro-inflammatoires, la broncho-pneumopathie chronique obstructive, le psoriasis, l'eczéma, l'obésité viscérale, le diabète de type 2, l'hypertension, la maladie oblitérante artérielle périphérique, l'hypercholestérolémie, la preeclampsie, le diabète mellitus, l'arrêt cardiaque, la maladie de l'artère coronaire, le syndrome des ovaires polykystiques, l'insuffisance rénale, la drépanocytose, l'amyotrophie, la sarcopénie, la rhabdomyolyse et la cachexie.
- [Revendication 4] Bactérie du genre *Massiliomicrobiota* pour son utilisation selon l'une des précédentes revendications, dans la prévention et/ou le traitement d'au moins une maladie chronique inflammatoire choisie parmi la colite ulcéreuse, la maladie cœliaque, la gastrite auto-immune, la maladie de Crohn, la rectocolite hémorragique, les hépatites, la stéatohépatite non alcoolique, la cholangite sclérosante primitive, les hépatites virales chroniques, la cirrhose, la stéatopathie métabolique, la stéatose hépatique non alcoolique, la pancréatite, la pancréatite aiguë, la polyarthrite rhumatoïde, la polyarthrite psoriasique, les encéphalo-myélites aiguës disséminées, la sclérose en plaques, les névrites optiques, les myélites transverses, les rhombencéphalites, les encéphalites auto-immunes, les maladies systémiques avec atteinte neurologique, le syndrome d'activation macrophagique, le syndrome d'opsoclonus-myoclonus ou les vascularités du système nerveux

- central ;
- [Revendication 5] Bactérie du genre *Massiliomicrobiota* pour son utilisation selon l'une des précédentes revendications, caractérisées en ce qu'elles ont au moins 94% de similitude avec le gène ribosomal de la sous-unité 16S de *Massiliomicrobiota timonensis*
- [Revendication 6] Bactérie du genre *Massiliomicrobiota* pour son utilisation selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que ladite bactérie est choisie parmi *Massiliomicrobiota timonensis* et *Massiliomicrobiota escudieri*.
- [Revendication 7] Composition comprenant au moins une bactérie du genre *Massiliomicrobiota* pour son utilisation comme médicament chez l'être humain ou l'animal.
- [Revendication 8] Composition pour son utilisation selon la précédente revendication, dans la prévention et/ou le traitement d'au moins une maladie choisie parmi les maladies inflammatoires chroniques, les cancers, l'obésité, les maladies rénales, les amyotrophies, les maladies caractérisées par une amyotrophie, les maladies caractérisées par une dysfonction endothéliale, les maladies caractérisées par une instabilité du cytochrome P450 chez l'être humain ou l'animal.
- [Revendication 9] Composition pour son utilisation selon la revendication 7 ou 8, caractérisée en ce qu'elle se présente sous forme liquide.
- [Revendication 10] Composition pour son utilisation selon la revendication 7 ou 8, caractérisée en ce qu'elle se présente sous forme solide.
- [Revendication 11] Composition pour son utilisation selon la revendication 8, caractérisée en ce que les bactéries sont présentes sous forme lyophilisée.
- [Revendication 12] Composition pour son utilisation selon l'une des revendications 7 à 11, caractérisée en ce que les bactéries présentes sont pour au moins 50% des bactéries vivantes (en nombre).
- [Revendication 13] Composition pour son utilisation selon l'une des revendications 7 à 12, caractérisée en ce que les bactéries présentes sont pour au moins 90% des bactéries vivantes (en nombre).
- [Revendication 14] Composition pour son utilisation selon l'une des revendications 7 à 13, par voie orale, rectale, inhalée ou topique.
- [Revendication 15] Composition pour son utilisation selon l'une des revendications 7 à 14, caractérisée en ce qu'elle se présente sous forme de poudre, de poudre microencapsulée, de gélule, de capsule, de comprimé, de pastille, de granulés, d'émulsion, de suspension ou de suppositoire.
- [Revendication 16] Composition pour son utilisation selon l'une des revendications 7 à 15,

- caractérisée en ce qu'elle se présente sous une forme gastro-résistante.
- [Revendication 17] Composition pour son utilisation selon l'une des revendications 7 à 16, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un probiotique et/ou au moins un prébiotique.
- [Revendication 18] Composition pour son utilisation selon l'une des revendications 7 à 17, caractérisée en ce qu'elle comprend également:
- au moins une bactérie associée à l'écosystème des bactéries du genre *Massiliomicrobiota* , et/ou
 - au moins une bactérie choisie parmi les bactéries du genre *Faecalibacterium*, *Christensenella*, *Akkermansia*, *Eubacterium* et *Oscillospira*, et/ou
 - au moins un polyphénol, et/ou
 - au moins un minéral et/ou au moins une vitamine et/ou au moins un agent nutritionnel, et/ou
 - au moins un autre principe actif pharmaceutique.

RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

L'I.N.P.I. annexe à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention, au sens des articles L. 611-11 (nouveau) et L. 611-14 (activité inventive) du code de la propriété intellectuelle. Ce rapport porte sur les revendications du brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

CONDITIONS D'ETABLISSEMENT DU PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.

Le demandeur a maintenu les revendications.

Le demandeur a modifié les revendications.

Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.

Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.

Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITES DANS LE PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.

Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.

Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.

Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

1. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION

S. NDONGO ET AL: ""Massiliomicrobiota timonensis," a new bacterial species isolated from the human gut",
NEW MICROBES AND NEW INFECTIONS,
vol. 13, 1 septembre 2016 (2016-09-01),
pages 25-26, XP055667410,
GB
ISSN: 2052-2975, DOI:
10.1016/j.nmni.2016.05.003

WO 2008/064489 A1 (UNIV MCMASTER [CA];
KUNZE WOLFGANG [CA] ET AL.)
5 juin 2008 (2008-06-05)

AARON P. VAN DER LEEK ET AL: "The Kynurenine Pathway As a Novel Link between Allergy and the Gut Microbiome",
FRONTIERS IN IMMUNOLOGY,
vol. 8, 6 novembre 2017 (2017-11-06),
XP055667993,
DOI: 10.3389/fimmu.2017.01374

ROSANNA TOFALO ET AL: "Polyamines and Gut Microbiota",
FRONTIERS IN NUTRITION,
vol. 6, 25 février 2019 (2019-02-25),
XP055668000,
DOI: 10.3389/fnut.2019.00016

BHAGAVATHI SUNDARAM SIVAMARUTHI ET AL: "A Review on Role of Microbiome in Obesity and Antiobesity Properties of Probiotic Supplements",
BIOMED RESEARCH INTERNATIONAL,
vol. 2019, 9 mai 2019 (2019-05-09), pages 1-20, XP055668039,
ISSN: 2314-6133, DOI: 10.1155/2019/3291367

YOU-LIN TAIN ET AL: "Toxic Dimethylarginines: Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) and Symmetric Dimethylarginine (SDMA)",
TOXINS,
vol. 9, no. 3, 6 mars 2017 (2017-03-06),
page 92, XP055668005,
DOI: 10.3390/toxins9030092

ANGELIKA CHACHAJ ET AL: "Asymmetric and symmetric dimethylarginines and mortality in patients with hematological malignancies-A prospective study",

PLOS ONE,
vol. 13, no. 5, 22 mai 2018 (2018-05-22),
page e0197148, XP055668007,
DOI: 10.1371/journal.pone.0197148

CHRISTIAN FLECK ET AL: "Serum
concentrations of asymmetric (ADMA) and
symmetric (SDMA) dimethylarginine in
patients with chronic kidney diseases",
CLINICA CHIMICA ACTA,
vol. 336, no. 1-2,
1 octobre 2003 (2003-10-01), pages 1-12,
XP055551033,
AMSTERDAM, NL
ISSN: 0009-8981, DOI:
10.1016/S0009-8981(03)00338-3

BIAGIO R DI IORIO ET AL: "Nutritional
therapy reduces protein carbamylation
through urea lowering in chronic kidney
disease",
NEPHROLOGY DIALYSIS TRANSPLANTATION.,
vol. 33, no. 5,
11 juillet 2017 (2017-07-11), pages
804-813, XP055668017,
GB
ISSN: 0931-0509, DOI: 10.1093/ndt/gfx203

JEFFERY ESCOBAR ET AL: "Leucine and
[alpha]-Ketoisocaproic Acid, but Not
Norleucine, Stimulate Skeletal Muscle
Protein Synthesis in Neonatal Pigs",
THE JOURNAL OF NUTRITION,
vol. 140, no. 8, 9 juin 2010 (2010-06-09),
pages 1418-1424, XP055667034,
US
ISSN: 0022-3166, DOI:
10.3945/jn.110.123042

ANDREA TICINESI ET AL: "Aging Gut
Microbiota at the Cross-Road between
Nutrition, Physical Frailty, and
Sarcopenia: Is There a Gut-Muscle Axis?",
NUTRIENTS,
vol. 9, no. 12,
30 novembre 2017 (2017-11-30), page 1303,
XP055667030,
DOI: 10.3390/nu9121303

2. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE GENERAL

NEANT

3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND

DE LA VALIDITE DES PRIORITES

NEANT