

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-501095

(P2004-501095A)

(43) 公表日 平成16年1月15日(2004.1.15)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 35/74	A 6 1 K 35/74	4 B O 1 8
A 2 3 L 1/30	A 2 3 L 1/30	4 B O 6 3
A 6 1 P 1/04	A 6 1 P 1/04	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/20	C 1 2 N 1/20	4 C O 8 7
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 54 頁)

(21) 出願番号	特願2001-581840 (P2001-581840)	(71) 出願人	500470471 アンスティテュ ナショナル ド ラ ルシエルシュ アグロノミク フランス国パリ、リュ、ド、リュニベルシ テ、1 4 5
(86) (22) 出願日	平成13年5月11日 (2001. 5. 11)	(71) 出願人	502408104 ディジュスター フランス国サン - ボージュル、ピオポール 、クレルモン - リマーニュ
(85) 翻訳文提出日	平成14年11月11日 (2002. 11. 11)	(74) 代理人	100075812 弁理士 吉武 賢次
(86) 国際出願番号	PCT/FR2001/001426	(74) 代理人	100091487 弁理士 中村 行孝
(87) 国際公開番号	W02001/085187	(74) 代理人	100094640 弁理士 紺野 昭男
(87) 国際公開日	平成13年11月15日 (2001. 11. 15)		
(31) 優先権主張番号	00/06009		
(32) 優先日	平成12年5月11日 (2000. 5. 11)		
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 消化器系障害の予防または治療のための水素依存性酢酸生成株の使用

(57) 【要約】

本発明は、消化ガスの発生に関連する胃腸障害を治療もしくは予防する、および/または哺乳類の消化器生態系の細菌バランスを調整する組成物を製造するための非病原性水素依存性酢酸生成細菌株の使用に関する。本発明はまた、該医薬または食品組成物、ならびに該株をモニターおよび生産するための方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

胃腸障害を治療もしくは予防する、および/または哺乳類の消化器生態系の細菌バランスを調整する組成物を製造するための少なくとも 1 種類の非病原性水素依存性酢酸生成細菌株の使用。

【請求項 2】

胃腸障害が a) 過度の鼓脹、鼓腸、膨満または腹痛を特徴とする機能性腸疾患、すなわち過敏性腸症候群、ならびに b) 潰瘍性大腸炎、炎症性腸疾患、およびクローン病からなる群に含まれる、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 3】

少なくとも 1 種類の非病原性水素依存性酢酸生成細菌株が該哺乳類の自己株である、請求項 1 または 2 に記載の使用。

【請求項 4】

少なくとも 1 種類の非病原性水素依存性酢酸生成細菌株が消化管で生存能力がある、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 5】

少なくとも 1 種類の非病原性水素依存性酢酸生成細菌株がラミノコッカス、クロストリジウムまたは連鎖球菌属に属する、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 6】

少なくとも 1 種類の非病原性水素依存性酢酸生成細菌株がラミノコッカス・ヒドロゲノトロフィカス種に属する、請求項 5 に記載の使用。

【請求項 7】

哺乳類がヒトである、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 8】

少なくとも 1 種類の非病原性水素依存性酢酸生成細菌株が、それが結腸で活性となる形態で投与される、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 9】

少なくとも 1 種類の非病原性水素依存性酢酸生成細菌株を含有する組成物が経口または直腸投与される、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 10】

少なくとも 1 種類の非病原性水素依存性酢酸生成細菌株が嫌気環境でパッケージングされる、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 11】

組成物が消化器環境で少なくとも 1 種類の株の活性を増強する少なくとも 1 つの添加剤を含んでなる、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 12】

組成物が、目的とする少なくとも 1 つの病状に対して活性である少なくとも 1 つの別の薬剤もまた含んでなる、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 13】

組成物が医薬上許容される担体もまた含んでなる、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 14】

少なくとも 1 種類の非病原性水素依存性酢酸生成細菌株を含有する医薬または食品組成物。

【請求項 15】

少なくとも 1 種類の非病原性水素依存性酢酸生成細菌株がラミノコッカス、クロストリジウムまたは連鎖球菌属に属する、請求項 14 に記載の組成物。

【請求項 16】

少なくとも 1 種類の非病原性水素依存性酢酸生成細菌株がラミノコッカス・ヒドロゲノトロフィカス種に属する、請求項 15 に記載の組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 17】

消化器環境で少なくとも 1 種類の株の活性を増強する少なくとも 1 つの添加剤を含んでなる、請求項 14 ~ 16 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 18】

請求項 1 に従って使用される非病原性水素依存性酢酸生成細菌株を哺乳類の消化管で特異的にモニターする方法であって、以下の工程を含んでなる方法。

- a. 検出が所望される非病原性水素依存性酢酸生成株に特異的なヌクレオチド配列（プローブ）を定義し、
- b. そのプローブを、糞便細菌叢から抽出された全核酸、またはスライドに付着した糞便細菌とハイブリダイズさせることにより該株を検出および / または定量する。

10

【請求項 19】

請求項 1 に記載の使用に向けたある非病原性水素依存性酢酸生成細菌株の生産方法であって、以下の工程を含んでなる方法。

- a. 該株を偏性嫌気条件下、エネルギー源として炭素系基質および / または H_2 / CO_2 の存在下で好適な培地で増殖させ、
- b. 細菌細胞を回収し、
- c. 細菌細胞を選択された医薬剤形にパッケージングする。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、消化ガスの発生に関連する胃腸障害を治療もしくは予防する、および / または哺乳類の消化器生態系の細菌バランスを調整する組成物を製造するための非病原性水素依存性酢酸生成細菌株の使用に関するものである。

20

【0002】

西欧人口の機能性消化器障害または機能性腸疾患の罹患率は、成人人口の約 25% ~ 30% であることが統計的に予測され、極めて高いものになっている。また、これらの消化器系障害が胃腸病学的診察を受ける主な理由の 1 つにもなっている（診察の約 50%）。これらの腸障害の症状は腸管滞留性の改変、鼓腸（meteorism）、腹痛および膨満（bloating）など多様である。これらの機能性障害の原因はさしあたり完全には明確になっていないが、結腸内での消化中に発生するガスが過度の鼓脹（flatulence excess）、腹部膨張（abdominal distension）（膨満（bloating））および関連痛などのある症状の発症に重要な役割を果たしているものと推測される。例えば、活性炭、シメチコン、スメクタイト、鎮痙薬、および発酵性物質（サッカロミセス・セレビスエ（Saccharomyces cerevisiae）、ビフィズス菌（Bifidobacterium）、乳酸桿菌（Lactobacillus）、植物もしくは繊維（オリゴフルクトース、フェネル、藻、オート麦、カンキツ属の果実など）を含有する、または鉱物構造（オクタライトなど）を有するある栄養補助食品など、いくつかの治療が提案されてきた。しかしながら、結腸内でのガス発生に関連した症状に対するこれらの治療の効果は不十分であり、選択的に作用するものでもない。本発明では、結腸内でのガス発生に関連した消化器系の不快感の治療および予防の両面から先行技術の欠点を補うことを考える。

30

40

【0003】

これに関し、本発明は水素依存性酢酸生成細菌の生理学的特性、すなわち消化発酵ガス（ H_2 および CO_2 ）の全容積を減少させるそれらの能力と消化器生態系において他の水素依存性微生物に比べて重要な生態環境上の利点をそれらに与えるそれらの栄養多様性とをもとにしたものである。

【0004】

ヒトでは、小腸で消化および吸収されなかった食物炭水化物は結腸に到着し、そこでそれらは複合マイクロフローラによって発酵される。有機物質のこの嫌気分解によって最終代謝産物が代謝（酢酸塩、プロピオン酸塩）または栄養（酪酸塩）特性を有する揮発性脂肪酸およびガス（ H_2 、 CO_2 および、ある個体では CH_4 ）として生成される。

50

【0005】

これらの発酵ガスのうち、 H_2 はヒト結腸内の有機物質の分解の継続および有効性において重大な役割を果たしている。一部の H_2 は呼吸および直腸経路を介して排出されるが、このガスのほとんどのものは腸内細菌叢により *in situ* で再び使用されている。後者のものは水素依存性細菌叢と呼ばれるものであり、硫黄還元細菌およびメタン生成古細菌で構成されている。

【0006】

硫黄還元細菌は全ての個体の消化器マイクロフローラで見られる (Pochard et al. (1992) FEMS Microbiol. Lett. 98 p225)。これらは H_2S を合成するが、これは真核生物細胞に対して著しい毒性産物であり、さらにいくつかの消化器系疾患、特に潰瘍性大腸炎と関係していると考えられるものである (Roediger et al. (1993), Gastroenterology, 104, p802)。

【0007】

メタン生成古細菌は CH_4 を生成するが、これは非毒性ガスである。このメタン産生はごく少数のヒト個体群 (インド人成人の約21%、アフリカ黒人青年の地方人口の95%、および西欧人口の40%) でのみ見られ、これは呼吸経路を介して排出される、またはこれが排出されて鼓腸状態になると考えられている (Segal et al. (1988) Gut 29 p608; Pochart et al. (1992) FEMS Microbiol. Lett. 98 p225)。これらの個体はメタン排泄者と呼ばれ、かなり多くの個体数のメタン生成古細菌が宿っている ($> 10^8$ / 乾燥糞便抽出物g) (Durand et al. (1996) in: Malkki Y and Cummins JH (欧州共同体刊行物版, p58)。これらの個体では、メタン産生が H_2 排出の主要経路となっている。

【0008】

メタン排泄者ではない個体は、その中に還元的酢酸生成が存在する別の機構により H_2 を再使用する。非メタン排泄者ではこの経路が H_2 を使用する重大な代謝プロセスを構成している。

【0009】

非メタン排泄個体の糞便マイクロフローラが主に H_2 および CO_2 を代謝によって酢酸塩とし、一方、メタン排泄個体のものは H_2 および CO_2 を使用してメタンを生成することが研究により実際に分かってきた (Lajoie et al. (1988) Appl. Environ. Microbiol. 54 p2733; Bernalier et al. (1996) FEMS Microbiol. Ecol. 19 p193)。同時に、Dore et al. (1995 FEMS Microbiol. Ecol. 17 p279) によってヒト結腸内のメタン生成古細菌数と酢酸生成細菌数との間に負の相関関係が存在することが示された。よって、非メタン排泄個体では結腸内にほとんどまたは全くメタン生成古細菌が宿っていないため、それらの酢酸生成活性の最大限の発現が可能なのである (Lajoie et al. (1988) Appl. Environ. Microbiol. 54 p2733; Bernalier et al. (1996) FEMS Microbiol. Ecol. 19 p193)。

【0010】

水素依存性酢酸生成細菌叢は重要な分類学的多様性により同定される。これは特にクロストリジウム (*Clostridium*)、ラミノコッカス (*Ruminococcus*) および連鎖球菌 (*Streptococcus*) 属に属する細菌種 (Bernalier et al. (1996) Curr. Microbiol. 33 p94)、さらにユーバクテリウム (*Eubacterium*) 属のある種 (Schink (1994) in: Drake HL (ed) Acetogenesis. New York: Chapman and Hall p197) で構成されている。

【0011】

10

20

30

40

50

「水素依存性酢酸生成細菌」とは、それらが H_2 / CO_2 を使用して独立栄養増殖する際に、またそれらが有機基質を使用して従属栄養増殖する際に、酢酸塩を合成する還元経路（またはWood-Ljungdahl経路）によりこの代謝産物を生成する細菌種を意味するものである。これらの水素依存性酢酸生成細菌は、実際には大きな栄養学的可能性を有するものであり、 H_2 / CO_2 を使用することのほか、多数の糖類および有機化合物を発酵させることが可能である（Bernalier et al. (1996) Cur r . Microbiol . 33 p94）。

【0012】

本発明の水素依存性酢酸生成細菌株は H_2 および CO_2 ガスから短鎖脂肪酸（SCFA）、特に酢酸塩を生成する。このSCFAの生成は宿主に種々の病状の予防（防御）または治療などの生理学的利点を与えるものである（下記を参照）。 10

培地中に有機化合物と H_2 / CO_2 が同時に存在する（ヒト結腸内で遭遇するものと同じ条件）ことから、水素依存性酢酸生成細菌株によって2つの基質が同時に使用されることになる（Breznak and Blum (1991), Arch. Microbiol . , 156 p105）。この現象は混合栄養と呼ばれるものであり、細菌がより多くのエネルギーを得ることでより早く増殖することが可能になる。

【0013】

そのため、数多くの有機基質を使用する能力および混合栄養により増殖する能力と組み合わせた H_2 / CO_2 消費能力によって、限定数の基質（ H_2 、蟻酸塩）しか使用しないメタン生成微生物群およびそれらの H_2 代謝が硫酸塩の存在に依存している硫黄還元個体群と比べ、かなりの生態学的利点が酢酸生成細菌に与えられる。 20

【0014】

プロピオン酸菌、乳酸桿菌（lactobacilli）、ビフィズス菌（Bifidobacteria）などの細菌を含有するあるプロバイオティック製品を使用することである患者の結腸内細菌叢を改変することが可能になる（Bougle et al. (1999) Scand. J. Gastroenterol. 34 p144; Venturi et al. (1999) Aliment. Pharmacol. Ther. 13 p1103）。

【0015】

従って、酢酸生成細菌の H_2 / CO_2 代謝能力によって、発酵ガスの全容積を減少させる、および宿主がそのエネルギー源を代謝できる酢酸塩を生成することで結腸内での発酵を最適な状態にすることができることから、酢酸生成細菌を食品医薬品または栄養補助食品として使用できる製品において、Fuller (1989, J. Appl. Bact . , 66 p365)により定義されたプロバイオティクスとして使用することが目的の著しく革新的な経路であることが分かる。このように、消化ガスを減少させることがこれらのガスの蓄積に関連する消化器系障害の予防および/または治療の有効な手段であると 30
考えられる。

【0016】

従って、本発明の目的は上記の消化器系障害を調節する、および/または哺乳類の細菌叢バランスを調整する非病原性水素依存性酢酸生成株の使用である。 40

【0017】

本発明の哺乳類は、好ましくは反芻動物などの複胃哺乳類とは対照的な単胃哺乳類である。ネコ科の動物およびイヌ科の動物、特に家畜哺乳類（ネコおよびイヌ）、さらにヒトが特に意図される。

【0018】

「非病原性」とは、その細菌種の存在と関係のある宿主において病理が立証されていない細菌種（GRAS（一般に安全と認識される）株）を意味するものである。

【0019】

かかる使用は多方面に構想し得るものである。本発明は、ある消化器系障害を予防および/または治療するための予防または治療的使用に関する。この予防および/または治療は 50

細菌叢を調整することにより結腸内で発生するガスの調節を介して行われる。この種の使用は医師または保健専門家の指導の下で計画され得るものである。この場合、保健専門家が投与量、治療期間、さらに目的とする消化器系障害の予防および/または治療に有効な非病原性水素依存性酢酸生成株とその他の有効成分との有力な組合せを決める。かかる使用には、後に記載する本発明の分析方法を用いた非病原性水素依存性酢酸生成株のモニタリングが必要である。

【0020】

本発明はまた、使用者自身が非病原性水素依存性酢酸生成株の投与を決める治療および/または予防的使用に関する。ここでの所望の目的は、例えば生活の質の向上を望む使用者の不快感を軽減することである。

10

【0021】

特に、本発明が目的としている消化器系障害は、その患者の生活の質に影響を及ぼす。

【0022】

患者は生じた消化器系の不快の程度および/または各人のこれらの障害への耐力によって医師の診察を受けるかどうかを決めている。

【0023】

特に、本発明は、以下の用途：

(1) 消化器機能性障害を予防および/または治療する、

(2) 酢酸生成細菌の活性を有利に高め、特にメタン生成および硫黄還元細菌叢を不利にすることにより結腸内の細菌叢バランスを調整すること

20

に向けた組成物を製造するための水素依存性酢酸生成株の使用に関する。

【0024】

後の事項の特徴として以下の：

(1) CH_4 ガスの形成を減少させる、

(2) 消化器系の病状の起こりおよび/または発症に関連した H_2S 、毒性産物の産生を減少させる

(3) 宿主の健康によい代謝産物の生成を助ける

という利点がある。

【0025】

特に、ラミノコッカス、クロストリジウムまたは連鎖球菌属の株、好ましくはラミノコッカス・ヒドロゲノトロフィカス (Ruminococcus hydrogenotrophicus) が用いられる。

30

【0026】

従って、本発明は、有力な毒性ガスの発生を減少させることにより胃腸障害を予防および/もしくは治療する、ならびに/または哺乳類の消化器生態系の細菌バランスを調整する組成物を製造するための少なくとも1種類の非病原性水素依存性酢酸生成細菌株の使用に関する。かかる食品または医薬組成物もまた本発明の対象である。

【0027】

上記の減少および/または上記の調整は、消化発酵中に産生する水素ガス (H_2) および/または二酸化炭素ガス (CO_2) の量を減少させることにより行われる。

40

【0028】

また、上記の減少および/または上記の調整は、結腸内の酢酸生成細菌叢の活性を高め、メタン生成および硫黄還元細菌叢に不利にすることによっても行われ得る。

【0029】

少なくとも1種類の水素依存性酢酸生成細菌株を含有する組成物の使用がその緩和を目的とする胃腸障害は、機能性腸疾患群、特に過敏性腸症候群の主な診断基準である過度の鼓脹 (excessive flatulence)、鼓腸 (meteorism)、膨満 (bloating) および腹痛に含まれるものである。少なくとも1種類の水素依存性酢酸生成細菌株を含有する組成物は潰瘍性大腸炎、炎症性腸疾患、またはクローン病の場合にも使用でき、これらの病気の症状を悪化させる原因である結腸内のガス容積を減少さ

50

せる。

【0030】

本発明の好ましい具体例では、上記の組成物がEC規制第258/97号で規定される新規食品または食品成分の作製、および特に機能性食品の製造に使用できる食品組成物である。ある食品が生物の1以上の目的の機能に対して通常の栄養学的効果よりも優れた有益な効果を与えることで、健康および安寧状態を向上させる、および/または疾患の危険性を低下させることが十分に立証された場合にはそれは機能的なものと考えられる(Diplock et al. Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document, British Journal of Nutrition, 1999, 81, S1-S27)。

【0031】

上記の組成物はパッケージングされた、例えばカプセル剤またはゼラチンカプセル剤形態のプロバイオティクスを特に構成する。

【0032】

このように、消化器系の不快感を軽減することにより、使用者に安寧感を与える非病原性水素依存性酢酸生成株を含有する本発明の食品組成物が使用できる。

【0033】

本発明のもう1つの好ましい具体例では、上記の組成物が賦形剤を含んでもよい医薬上許容される担体と組み合わせた医薬組成物である。これは好ましくは経口または直接 in situ、特に結腸内視鏡検査によりまたは坐剤により直腸投与される。

本発明のもう1つの具体例では、医薬組成物が目的とする少なくとも1つの病状に対して活性である少なくとも1つの別の薬剤もまた含んでなる。

【0034】

本発明の医薬または食品組成物は、ゼラチンカプセル剤、カプセル剤、錠剤、散剤、粒剤、または経口服液剤もしくは懸濁剤の形態で経口投与し得る。少なくとも1種類の細菌株をゼラチン、デンプン、ラクトース、ステアリン酸マグネシウム、タルク、アラビアゴムなどの通常の賦形剤と混合することができる。通常の賦形剤の使用を少なくすることもまた有利である。これにより結腸内で活性となるように使用する少なくとも1種類の細菌株の能力を高めることができる。例えば、セロビオース、マルトース、マンノース、サリシン、トレハロース、アミグダリン、アラビノース、メロビオース、ラムノースおよび/またはキシロースを加えてもよい。このリストは網羅的なものではなく、基質は考察した株との関係から選択され、適合される。これらの基質によって組成物に存在する少なくとも1種類の酢酸生成細菌株の従属栄養および/または混合栄養増殖を助けてもよい。

【0035】

従って、組成物は好ましくは消化器環境で少なくとも1種類の株の活性を増強する少なくとも1つの添加剤を含んでなる。

【0036】

本発明の特定の具体例では、医薬および/または食品組成物に存在する少なくとも1種類の非病原性水素依存性酢酸生成細菌株は、それが結腸で活性となる形態で投与される。特に、少なくとも1種類の非病原性水素依存性酢酸生成細菌株が消化管、特に結腸内で生存している、または生存能力があることが求められる。少なくとも1種類の非病原性水素依存性酢酸生成細菌株生産後、かつ生産方法に応じて、この株を嫌気パッケージング条件下で維持し、その生存状態を持続させることもできる。

【0037】

好ましい具体例では、少なくとも1種類の非病原性水素依存性酢酸生成細菌株が嫌気環境でパッケージングされる、すなわちそれが無酸素雰囲気下でパッケージングされる。

【0038】

本発明のもう1つの好ましい具体例では、組成物に存在する少なくとも1種類の非病原性水素依存性酢酸生成細菌株が上記の哺乳類の自己株である、すなわちそれが同属であるそ

の他の哺乳類の消化器系、特に糞便から単離することができる。

【0039】

好ましくは、特に哺乳類がヒトである場合、少なくとも1種類の非病原性水素依存性酢酸生成細菌株はラミノコッカス属に属し、いっそうさらには好ましくはラミノコッカス・ヒドロゲノトロフィカス種に属する。その他の水素依存性酢酸生成細菌、特に連鎖球菌またはクロストリジウム属の細菌、とりわけクロストリジウム・ココイデス (Clostridium coccoides) もまた使用できる。

【0040】

本発明はまた、非病原性水素依存性酢酸生成細菌株を上記のように使用した後、それを哺乳類の消化管で特異的にモニターする方法であって、以下の：

10

- a. その検出が所望される非病原性水素依存性酢酸生成細菌株に特異的なヌクレオチド配列(プローブ)を定義し、
- b. そのプローブを、糞便細菌叢から抽出された全核酸、またはスライドに付着した糞便細菌とハイブリダイズさせることにより上記の株を検出および/または定量する工程を含んでなる方法に関する。

【0041】

かかるモニター方法を行うため、本発明の対象でもある診断キットを開発することができる。かかるキットには、特に糞便内細菌量が測定できる「標準器」が含まれる。

【0042】

当業者はその他の細菌のDNAとハイブリダイズしない特定の配列を定義することができる。同様に、当業者はそれらに対して利用可能な手段および所望の精度に応じて膜でのハイブリダイゼーションまたは *in situ* ハイブリダイゼーションを選択する。

20

【0043】

好ましくは、検出された核酸が全細菌DNAであるが、DNAもしくはRNA混合物、または細菌RNA単独であってもよい。

【0044】

少なくとも1種類の非病原性水素依存性酢酸生成細菌株の存在は別の方法によっても調べることができる。

【0045】

特にPCRもしくはRT-PCR、または特定プローブでのハイブリダイゼーション(サザンまたはノーザン)による哺乳類糞便内の少なくとも1種類の非病原性水素依存性酢酸生成細菌株の核酸(DNAおよび/またはRNA)の検出では、上記の株の存在、および所望によりある遺伝子の発現の検出が可能である。有利な特定の配列は16S rRNAをコードする遺伝子の配列、特に結腸内細菌叢のその他の種には存在しない領域で選択できる。

30

【0046】

本発明はまた、上記のその使用に向けたある非病原性水素依存性酢酸生成細菌株の生産方法であって、以下の：

40

- a. その株を偏性嫌気条件下、エネルギー源として炭素系基質および/またはH₂/CO₂の存在下で好適な培地で増殖させ、
- b. 細菌細胞を回収し、
- c. 細菌細胞を選択された剤形にパッケージングする

工程を含んでなることを特徴とする方法に関する。

【0047】

その株は改変AC21培地(実施例1に記載)で発酵槽内37℃で、好ましくは増殖させる。炭素系基質はグルコースであってよい。

【0048】

細菌細胞を回収する好ましい方法は、例えば10000g~15000g間、有利には12000g、で15~20分間の遠心分離法である。当業者であればこれらのパラメータ

50

ーを最適なものにすることができる。

【0049】

有利には、工程 b ~ c 間に細菌を、特に嫌気リン酸バッファーで、細胞の懸濁、攪拌、およびさらなる遠心分離工程により洗浄してもよい。

【0050】

細菌ペレット（洗浄したまたは洗浄していない）は選択された剤形に関連してパッケージングされる。有利な方法は凍結乾燥法である。

【0051】

以下、実施例を挙げて本発明を説明するが、これらの実施例は本発明を限定するものではない。

10

【0052】

実施例 1：微生物の単離

健康な非メタン排泄ボランティア由来のヒト糞便サンプルを使用する。個体の呼気により排出されるメタンレベルが大気レベルの 1.8 ppm から 1 ppm 以内である場合 (Bond et al. (1970) Gastroenterology 58 p1035)、およびそれらの糞便抽出物内に含まれるメタン生成微生物数が糞便抽出物の 10^7 / g 未満である場合 (Bernalier et al. (1996) Arch Microbiol. 166 p176)、その個体を非メタン排泄者と考える。メタンレベルは水素炎イオン化検出器を備えたクロマトグラフを用いて測定される。新たに採取した糞便サンプルを偏性嫌気条件下、4 で最大 10 時間維持する。

20

【0053】

この微生物の濃縮、単離、および培養は偏性嫌気条件下、半合成培地、改変 AC - 21 培地 (Breznak et al. (1988) Arch Microbiol. 150 p282) で行う (Hungate (1969) in: Norris JR and Gibbons DW (eds) Methods in microbiology Vol. 3B, New York: Academic Press p117)。半合成培地 1 当たりの組成は以下の通りである：

KH ₂ PO ₄	0.2 g
NH ₄ Cl	0.25 g
KCl	0.5 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.15 g
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.6 g
NaSO ₄	0.1 g
酵母抽出物	0.5 g
トリプトン	2 g
微量元素溶液	1 ml
タンゲステン酸セレン溶液	0.1 ml
ビタミン溶液	5 ml
レザズリン溶液 (1%、w/v)	1 ml
NaHCO ₃ (1M)	30 ml
システイン / 硫化還元溶液 (1.25% / 1.25%、w/v)	20 ml

30

40

【0054】

微量元素溶液は Widdell et al. (1983, Arch Microbiol., 134, p286) に従って調製し、ビタミン溶液は Greening and Ledle (1989, Arch Microbiol., 151, p399) に従って調製する。タンゲステン酸塩 - セレン溶液は次の組成：20 mM NaOH 中 0.1 mM Na₂WO₄ および 0.1 mM Na₂SeO₃、を有している。

【0055】

ゲル化剤 (2% 寒天) を加えて半合成培地を固形化する。試験計画に合わせて、接種後、

50

培地のガスを H_2 / CO_2 または N_2 / CO_2 で置き換える。

【0056】

希釈培地は純粋な無機嫌気性培地である (Dore et al. (1995) FEMS Microbiol. Lett. 130 p7)。原液は糞便サンプルから調製 (1/10 w/v に希釈) する。連続10倍希釈物はストック懸濁液から調製する。このように調製した希釈物を唯一のエネルギー源として H_2 / CO_2 (60:40 v/v、202 kPa) を含む半合成液体培地に接種する (Dore et al. (1995) FEMS Microbiol. Lett. 130 p7; Bernalier et al. (1996) FEMS Microbiol. Ecol. 19 p193; Bernalier et al. (1996) Curr. Microbiol. 33 p94)。37 で20日間インキュベートした後、最大細菌増殖、ガス消費、および酢酸塩の化学量論生成を示す最大希釈チューブから濃縮物を得る (Bernalier et al. (1996) Curr. Microbiol. 33 p94)。培養物中のガス圧の低下は、Capsuhelic 型圧力計 (Dwyer, Instruments, Michigan City, Mich., USA) での分圧の直接測定により確認する。濃縮培養物を3回植え継いだ後、同一寒天培地およびエネルギー源として H_2 / CO_2 を含むロール-チューブによる方法 (Hungate (1969) in: Norris J R and Gibbons DW (eds) Methods in microbiology Vol. 3B, New York: Academic Press p117) により細菌コロニーを単離する。39 で20日間インキュベートした後、コロニーを液体培地に移す。ロール-チューブで3~5回連続して植え継いだ後に精製された培養物を得る。最後に、グラム染色を行い、位相差顕微鏡により培養物の純度を測定する。

10

20

【0057】

単離された水素依存性酢酸生成株の全DNAはLawson et al. (1989, FEMS Microbiol. Lett. 65 p41) の方法により抽出する。次いで、16S リボソームRNAをコードする遺伝子をユニバーサルプライマーARIおよびpHを用いてPCRにより増幅する。このPCR産物を精製した後、「ダイ-ジデオキシターミネーターサイクルシーケンス」キットおよびApplied Biosystem 373A型自動シーケンサーを使用して配列決定する。単離された酢酸生成株とその他の種間で相同な16S rRNA配列の調査はFASTAプログラム (配列データベースはEMBLおよびRDPのものである) を使用し、さらに示された基本パラメーターを用いて行う。配列アラインメントは手動で確かめる。

30

【0058】

この方法を用いてラミノコッカス属のある細菌が単離でき、これをラミノコッカス・ヒドロゲノトロフィカス種と同定した。この細菌は2001年5月10日にthe Deutsche Sammlung von Mikroorganismen [German Microorganism Collection] (Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Germany) へDSM10507、およびDSM14294として寄託した (ブダペスト条約)。

【0059】

実施例2：一般特性の検討

1 - グラム染色法 (常法)、およびBuck (1982 Appl. Environ. Microbiol. 44 p992) によるKOH試験により細菌の膜タイプを決める。
2 - 1mlの細菌懸濁液と数滴の H_2O_2 (30%) とを混合してカタラーゼ活性を測定する。放出される気泡の発生が幾分激しくなり、カタラーゼの存在が示される。

【0060】

3 - ジメチルp-フェニレンジアミンを飽和させた濾紙のディスクに細菌コロニーを置いてシトクロムオキシダーゼ活性を調べる。ディスクが直ちに赤/紫色に発色するとこの試験に対して陽性である。

【0061】

40

50

4 - 2% 酢酸ウラニルでのネガティブ染色法後、位相差顕微鏡および電子顕微鏡により培養物の形態的特徴を調べる。細胞は2% グルタルアルデヒドで予備固定した(4 で15時間)後、2% OsO_4 で固定する(4 で最大15時間)。次いで、この細胞をE P P O N - 8 1 2 に包埋し、ブロックを超薄片に切る。これらの切片を酢酸ウラニルで染色し、酢酸塩に浸漬し、さらに透過型電子顕微鏡(Philips 400)で観察する。

【0062】

5 - O_2 存在または不在下の増殖を観察して細菌の呼吸タイプを調べる。

6 - 半合成培地の $\text{CO}_2 / \text{NaHCO}_3$ 比を改変してpHの変化が細菌の増殖に与える影響を調べる(Costilow (1981) American Society for Microbiology, Washington DC p66)。細菌増殖は37 10
で24または48時間インキュベートした後に測定する(DO600)。最適増殖温度をグルコースを含有する半合成培地で調べ、20~45 の範囲の温度で増殖を観察する。各試験を3回行う。細菌増殖はSpectronic 20D分光光度計(Bioblock Scientific, Illkirch, France)を使用してモニターする。

【0063】

ラミノコッカス・ヒドロゲノトロフィカスDSM10507が孢子未形成偏性嫌気グラム陽性球桿菌であることが分かった。ネガティブ染色では遊走子の不在が示される。細菌細胞は一個体または2つ一組で存在する。この株にはカタラーゼまたはシトクロムオキシダーゼが存在しない。最適増殖温度およびpHは各々、35~37 および6.6である。20
コロニーは半透明の白色~わずかに茶色の、規則性のあるエッジを有する円形(直径1~2mm間)である。

【0064】

実施例3：増殖試験、酢酸生成活性の測定

種々の細菌株の H_2 / CO_2 代謝能力および酢酸生成能力を調べる。ラミノコッカス・ヒドロゲノトロフィカス(Ruminococcus hydrogenotrophicus)DSM10507、ならびにこれらの分類学的に近いラミノコッカス・プロダクタス(Ruminococcus productus)DSM3507、ラミノコッカス・プロダクタスDSM2950、ラミノコッカス・ハンセニー(Ruminococcus hansenii)DSM20583およびクロストリジウム・ココイデス(clostridium coccoides)DSM935(DSM番号はthe Deutsche Sammlung von Mikroorganismenに寄託された生物の番号である)株をエネルギー源として H_2 / CO_2 (60:40、v/v、202kPa)の存在下、改変AC-21培地でインキュベートする。対照培養物は N_2 / CO_2 (60:40v/v、150kPa)下でインキュベートする。各細菌株に対して3種類の培養物(1対照物および2試験物)を準備する。 H_2 / CO_2 (60:40v/v、202kPa)の存在下での96時間のインキュベーションにより独立栄養増殖を確認する。37 30
で6日間インキュベートした後、酢酸塩生成を酵素試験(Boehringer Mannheim, Meylan, France)により定量する。

【0065】

H_2 / CO_2 消費量は

1)消費したガス容積の測定

2)気相の組成物のクロマトグラフィー(CPG)分析

により測定する。

【0066】

酢酸生成株の従属栄養増殖(OD_{600})は唯一のエネルギー源としてグルコース(2g/l)またはフルクトース(2g/l)を加え、細菌を20時間インキュベートして調べる。

【0067】

グルコース発酵は2g/lのグルコースを含有する半合成培地で、さらに100% CO_2 50

で構成される雰囲気下で細胞を37℃で20時間インキュベートして調べる。インキュベーション終了時に上清の揮発性脂肪酸が第3級ブチルジメチル誘導体へ変換した後、これをクロマトグラフィーにより定量する(Richardson et al. (1989) Lett. Appl. Microbiol. 9 p5)。

【0068】

基質としてH₂/CO₂(60:40、v/v、202kPa)の存在下、改変AC-21培地で37℃では、R.ヒドロゲノトロフィカスが26.4時間で2倍になることが観察される。エネルギー源としてグルコースまたはフルクトースを加えた場合には、37℃においてR.ヒドロゲノトロフィカスが約2または3時間で2倍になる。

【0069】

調べた細菌株が酢酸生成能力を有することが分かる：これはH₂/CO₂の存在下での独立栄養増殖を示し、主な代謝産物として酢酸塩を生成する(表1)。分類学的に近い種では、C.ココイデスで酢酸生成活性が認められる。また、かなり弱いものではあるがR.ハンセニーおよびR.プロダクタスでもそれが認められる。

【0070】

R.ヒドロゲノトロフィカスDM10507は37℃で96時間の培養後、約120mMのH₂を消費している(1時間当たり1.25mMのH₂が消費される)。その時の全酢酸塩生成量は30mMに相当する(化学量論：生成される酢酸塩に対し、4倍のH₂が消費される)。

【0071】

【表1】

10

20

表I：唯一のエネルギー源としてH₂/CO₂またはグルコースの存在下で培養した株の発酵特性

特性	R. ヒドロゲノ トロフィカス DSM 10507	C. ココイデス DSM 935	R. プロダクタス DSM 3507	R. プロダクタス DSM 2950	R. ハンセニー DSM 20853
H ₂ /CO ₂ の使用	++	+	-	+	+/-
H ₂ /CO ₂ FP					
酢酸塩	++	+	-	+	+/-
プロピオン 酸塩	-	-	-	-	-
酪酸塩	-	-	-	-	-
乳酸塩	-	-	-	-	-
コハク酸塩	-	-	-	-	-
エタノール	-	-	-	-	-
グルコース FP					
酢酸塩	++	+	++	++	++
プロピオン 酸塩	-	-	-	-	-
酪酸塩	-	-	-	-	-
乳酸塩	+	-	-	-	+
コハク酸塩	-	++	-	-	+
エタノール	+	-	+	+	-

符号： FP：発酵産物； ++、主要代謝産物； +、非主要代謝産物； +/-、少量の代謝産物； -、代謝産物なし

【0072】

実施例4：¹³C O₂の酢酸塩への取り込み定量(NMR法)によるR.ヒドロゲノトロフィカスの水素依存性酢酸生成活性の測定

H₂存在下で培養したR.ヒドロゲノトロフィカスの細胞懸濁液を用いてNMRにより¹³C O₂の酢酸塩への取り込みを定量する。細菌を実施例1に記載した250mlのAC21培地、および唯一のエネルギー源としてH₂/CO₂を含む1リットル容フラスコで培養する。37℃で増殖させた後、この細菌を遠心分離(12000gで20分間)により回収し、20mMのNaH¹³CO₂を含有するリン酸バッファーで再懸濁する(Leclerc et al (1997), Anaerobe, 3, p307)。この懸濁液を100%N₂(対照)またはH₂/N₂(80:20、v/v)、101気圧で構成される雰囲気下で37℃で20時間インキュベートする。インキュベーション終了時に懸濁液をさらに12000gで20分間遠心分離し、上清を回収する。全酢酸塩生成を酵素試験(Boehringer Mannheim kit)により定量する。¹³C標識代謝産物はNMRにより分析する(Bernalier et al, (1996), FEMS Microbiol. Ecol., 19 p193)。

【0073】

10

20

30

50

この細菌をH₂存在下で培養した場合に、¹³C NMRにより検出される唯一の代謝産物が酢酸塩である。¹³C酢酸塩はそのメチルおよびカルボキシル基で等しく標識されている。二重標識された酢酸塩は全標識酢酸塩の72%にあたる。このことからR.ヒドロゲノトロフィカスによるH₂およびCO₂からの酢酸塩の合成が還元的酢酸生成経路によって起こることが確認できる。

【0074】

実施例5：酢酸生成菌の栄養学的能力の測定

酢酸生成菌によるその他の有機基質の代謝を5または10mMの基質を含有する改変AC-21培地を用い、100%CO₂で構成される雰囲気下で測定する。

【0075】

同じ基質を含有する培地での植え継ぎを3回繰り返した後に細菌がその増殖を維持している場合、および37で24時間インキュベートした後に培養物のOD₆₀₀が基本半合成培地(有機基質を含まない)で観察されるものの少なくとも2倍に等しい場合、その試験が陽性であると考えられる。

【0076】

数多くの有機基質が考察した細菌の従属栄養増殖を可能にしていることが分かる(表II)。

【0077】

【表2】

表II：R.ヒドロゲノトロフィカスとこの分類学的に近い種の種々の有機基質の存在下での増殖

基質	R. ヒドロゲノ トロフィカス DSM 10507	C. ココイデス DSM 935	R. プロダクタス DSM 3507	R. プロダクタス DSM 2950	R. ハンセニー DSM 20853
デンプン	-	-	+	+	-
アミグダリン	-	+	+	+	+/-
アラビノース	-	+	+	+	-
セロビオース	+	+	+	+	-
フルクトース	+	+	+	+	-
ガラクトース	+	+	+	+	+
イヌリン	-	-	-	-	+
ラクトース	+	+	+	+	+
マルトース	+/-	+	+	+	+
マンニトール	-	+	+	+	-
マンノース	+	+	+	+	-
メリビオース	+/-	+	+	+	+
ラフィノース	+	+	+	+	+
ラムノース	-	+	-	-	-
サリシン	+	+	+	+	-
ソルビトール	-	+	+	+	-
スクロース	-	+	+	+	-
トレハロース	+	+	+	+	+
キシロース	-	+	+	+	-

符号： -、肉眼で認識可能な増殖なし； +/-、弱い増殖； +、優れた増殖

10

20

30

40

50

【0078】

さらに、ヒト便から単離した種々の水素依存性酢酸生成株のバニリン酸塩、コーヒー酸塩またはシリリング酸塩などの種々の芳香族化合物の存在下での増殖を Spectronic 20D 分光光度計を使用して 600 nm で光学濃度を測定することにより定量する（気相への H₂ 添加によるこれらの培養物の影響も調べる）。分解された基質量を生成された代謝産物の性質から HPLC により測定する。

【0079】

調べた種々の芳香族化合物の代謝能力は考察する水素依存性酢酸生成株によって異なる。クロストリジウム種は増殖し、コーヒー酸塩およびシリリング酸塩の 20% ~ 30% を分解することができるが、培養物に H₂ を添加した場合にはこの分解が 100% に達する。クロストリジウム株のあるものは気相に H₂ が存在する場合のみバニリン酸塩を分解する。この株は第 1 の工程でバニリン酸塩を脱メチル化してプロトカテキン酸塩にした後、この化合物を H₂ を用いて脱カルボキシル化してカテコールにする。R. ヒドロゲノトロフィカス株はバニリン酸塩に対して弱い活性しか示さないため、この代謝には H₂ の存在による影響がないことが分かる。

10

【0080】

宿主の酵素により消化できない 2 種類の有機基質、フルクト - オリゴ糖 (FOS) およびラクツロースを使用する R. ヒドロゲノトロフィカスの能力もまた、本実施例に記載のプロトコールに従って測定する [消化できにくい各基質 2 g / l の存在下で見られる細菌増殖の測定 (600 nm での光学濃度)、および同一基質への植え継ぎを 3 回繰り返した後のこの増殖の維持]。R. ヒドロゲノトロフィカスがこれらの 2 種類の有機基質を代謝できないことが分かる。

20

【0081】

実施例 6 : 水素依存性酢酸生成株ラミノコッカス・ヒドロゲノトロフィカスの混合栄養性
R. ヒドロゲノトロフィカスが混合栄養 (有機基質および無機基質の同時使用) により増殖できるかどうかを確認するためにこの株を 2 種類のエネルギー源、一方の有機はグルコースおよびもう一方の無機は H₂ / CO₂、の存在下で培養する。この培地 (実施例 1 に記載の改変 AC 2 1 培地) は 1.4 mM のグルコースを含有しており、さらに接種後に気相を H₂ / CO₂ (60 : 40、156 kPa) の混合物で置き換える。培養物に唯一のエネルギー源をグルコースまたは H₂ / CO₂ のいずれかとして得た R. ヒドロゲノトロフィカスの予備培養物 0.3 ml を接種する。37 °C でのインキュベーション間、培養栓に付属の圧力センサーを使用してこの株によるガスの消費をモニターする (Lecclerc et al. (1997), Anaerobe, 3, p307)。細菌増殖は Spectronic 20D 分光光度計を使用して 600 nm で培養物の光学濃度を測定することにより定量する。培養物上清サンプルを 2 時間毎に採取し、グルコース消費 (Boehringer 酵素法を使用した残留グルコースのアッセイ) および発酵による代謝産物生成 (クロマトグラフィーによるアッセイ (実施例 3 に記載)) を定量する。

30

【0082】

R. ヒドロゲノトロフィカスが調べた 2 種類の基質を同時に使用することができることが分かる。2 種類の基質の存在下では細菌の指数増殖期が 1 度だけ観察される。この指数増殖期ではグルコースおよび H₂ / CO₂ の同時消費が認められる。このことから、これら 2 種類の基質に対して R. ヒドロゲノトロフィカスの混合栄養性が示される (Lecclerc and Bernalier、刊行物へ提出)。グルコースは指数増殖期の終わりには細菌により完全に消費されてしまっているため、定常増殖期にはこの細菌は残留する H₂ / CO₂ を使用することによりその代謝を維持している。

40

【0083】

また、R. ヒドロゲノトロフィカスの甘味剤、フルクトースおよび H₂ / CO₂ を同時代謝する能力も調べる。この株をこれらの 2 種類のエネルギー源の存在下、実施例 1 に記載の改変 AC 2 1 培地で培養する。気相は H₂ / CO₂ (60 : 40、v / v、202 kPa) 構成のまま、種々の濃度のフルクトース (2、1、0.5 および 0.25 g / l) を

50

試験する。この際に使用する試験プロトコールは上記のものと同じである。

【0084】

R・ヒドロゲノトロフィカスがフルクトースおよび H_2 / CO_2 を同時代謝することができ、2種類の基質の存在下での細菌増殖が1度だけの指数増殖期を特徴としていることが分かる。培地に存在するフルクトース濃度がいかなるものであっても、さらには細菌接種物の起源がいかなるものであっても（フルクトースまたは H_2 / CO_2 もしくはフルクトース+ H_2 / CO_2 で調製した予備培養物）この混合栄養増殖は観察される。定常増殖期には全てのフルクトースが消費されてしまっているため、この細菌は H_2 / CO_2 だけを代謝する。

【0085】

実施例7：ラミノコッカス・ヒドロゲノトロフィカス培養物の凍結乾燥により水素依存活性の発現に与える影響

R・ヒドロゲノトロフィカスを凍結乾燥形態で保存することにより H_2 / CO_2 を使用するその能力を損なわれるかどうかを確認するため、培養、凍結乾燥物の保存、および細菌の再懸濁についての種々の条件を調べる。

R・ヒドロゲノトロフィカス培養物を、実施例1に記載した250mlのAC21培地を含み、エネルギー源としてフルクトース(2g/l)、 H_2 / CO_2 (60:40 v/v、100kPa)または両方の基質を添加した1リットル容フラスコで準備する。使用する各基質に対して、これらの培養物を37で24時間、48時間または72時間インキュベートする。次いで、培養物の遠心分離(15300xg、30分、4)により細菌ペレットを得、10mlの嫌気バッファーに溶解する。このようにして得られた懸濁液を2mlずつに分けた後、14000xgで5分間遠心分離する。次いで、細菌ペレットを-80で冷凍した後、一晚凍結乾燥する。凍結乾燥物は好気または嫌気(100% CO_2)雰囲気下4で保存する。15~30日間保存した後、R・ヒドロゲノトロフィカス凍結乾燥物を5mlの嫌気希釈バッファーに溶解する。その後、これらの細菌懸濁液をそのまま、または種々の炭素源を含有する完全培地で37で48時間濃縮した後に、唯一のエネルギー源として H_2 / CO_2 (60:40、v/v、200kPa)を含むAC21培地に接種する。 H_2 / CO_2 の存在下で37で72時間インキュベートした後、各培養物について H_2 消費量および生成した酢酸塩量を測定する。

【0086】

R・ヒドロゲノトロフィカスの凍結乾燥によりその水素依存能力に与える影響は見られない。この株を予備培養するのに使用した基質がいかなるものであっても（フルクトース、 H_2 / CO_2 または両方の基質を同時に）凍結乾燥物を培養状態に置くとR・ヒドロゲノトロフィカスの水素依存活性が復帰することがこの理由である。同様に、凍結乾燥物の好気または嫌氣的保存方法によっても、この細菌の水素依存能力の発現への影響はほとんどない。しかしながら、最大の水素依存活性はR・ヒドロゲノトロフィカスをフルクトースの存在下で予備培養した場合、および凍結乾燥物を嫌気雰囲気下で保存した場合に見られる。同様に、この株を予備培養するのに使用した基質がいかなるものであっても、さらに凍結乾燥物の保存方法がいかなるものであっても、有機基質を多く含む培地で凍結乾燥される細菌を予め培養することによりそれらの水素依存能力の発現は実質的に高められる。この効果は完全培地での凍結乾燥培養物の濃縮によって生じる細菌密度の高まりから説明されよう。

【0087】

得られた全ての結果から、R・ヒドロゲノトロフィカス株を有機基質の存在下で培養し、凍結乾燥形態で好気または嫌気雰囲気下、4で保存でき、このことによるその水素依存能力のその後の発現への実質的な影響がないことが示される。

【0088】

実施例8： H_2 生成繊維分解細菌とR・ヒドロゲノトロフィカス間の*in vitro*における H_2 の種間移行

*in vitro*において繊維分解細菌種により生成された H_2 をR・ヒドロゲノトロフ

10

20

30

40

50

イカスが使用する能力を酢酸生成株とセルロース分解細菌とを組み合わせた同時培養により調べる。調査する2種類のセルロース分解種はヒト便から実験室で単離した。実験室で開発した、唯一の炭素およびエネルギー源としてWhatman No. 1濾紙のセルロース小ストリップを含む半合成培地で同時培養物を準備する。これらのセルロース分解種を各々、培養チューブ当たり接種物0.5mlの割合で接種する。37℃で48時間インキュベートした後、0.5mlのR.ヒドロゲノトロフィカス接種物をこれらのセルロース分解細菌培養物各々に加える。各セルロース分解種の対照単一種培養物も同時に準備する。

【0089】

培養物を37℃で12日間インキュベートすることにより動態が得られる。インキュベーション後、気相のH₂量をクロマトグラフィーにより分析し、分解されたセルロース量を残留固体の測定により定量し、さらにセルロースの最終発酵産物を気相クロマトグラフィーおよび/または酵素経路(Rocheキット)により確認する。

【0090】

R.ヒドロゲノトロフィカスを一方またはもう一方のH₂生成セルロース分解種に加えることにより同時培養物中のこのガスは大いに減少するが、単一種培養物の気相ではこれが蓄積することとなる。

そのため、繊維分解種によりセルロース発酵中に*in vitro*において生成されたH₂をR.ヒドロゲノトロフィカスは効率的に再使用することができる。R.ヒドロゲノトロフィカスとセルロース分解種間のこのH₂移行により、調査した繊維分解種のセルロース分解活性の改変はほとんどまたは全く起こらない。また、同時培養物ではセルロースは主に酢酸塩に発酵されるが、単一種培養物では混酸型(酢酸塩、コハク酸塩またはエタノールおよび乳酸塩の生成)である。

【0091】

実施例9：ヒト細菌叢保有ラットでの水素依存性酢酸生成株ラミノコッカス・ヒドロゲノトロフィカスが*in vivo*において結腸内ガス容積を減少させる能力

R.ヒドロゲノトロフィカスが消化器系混合細菌叢の存在下で結腸内ガス容積を減少させることができるかどうかを確認するため、R.ヒドロゲノトロフィカスをヒト細菌叢保有ラットに経口投与し、呼吸および直腸経路を介して排出される水素を測定することにより結腸内ガス容積の変化をモニターする。

【0092】

通常の栄養状態における、および結腸内ガス容積の急激な増大をもたらす発酵性基質(ラクツロース)投与後のR.ヒドロゲノトロフィカスの効果を調べる。

【0093】

使用する動物は雄Fischer 344ラット、3ヶ月齢(試験開始時)である。無菌状態で生まれたこれらのラットに西洋型食生活を送っている非メタン生成成人ドナーの新鮮なヒト糞便物の百分の1懸濁液1mlを経口接種する。この接種を試験開始前に2週間行う。ラットを隔離装置に収容し、45kGyでの照射により殺菌した半合成「ヒト型」食事(動物および植物性タンパク質ならびに脂肪;未加工および調理済の単純ならびに複合炭水化物)を与える。食料および飲料水の供給は無制限である。

【0094】

a) 通常の栄養状態

試験は16匹のヒト細菌叢保有ラットを8匹からなる2つの群、対照群および処置群に分けて行う。処置群のラットは28日間毎朝、10⁸~10⁹細菌量を、グルコース(2g/l)を含有するAC21培地(実施例1に記載)で18時間培養したR.ヒドロゲノトロフィカス培養物1mlとして胃挿管により受ける。対照群は同一条件下でグルコースを含有する滅菌AC21培地1mlを受ける。

【0095】

処置から1、14、および28日後、2群のラットを呼吸および直腸経路を介して排出される水素が測定できる各呼吸チャンバーに12時間置く(下記の呼吸チャンバーについて

の説明を参照)。0時間～12時間の間に呼吸チャンバーの空気サンプルを2つずつ採取する。そのまま水素濃度を気相クロマトグラフィーにより測定する。対照および処置群の結果を反復測定分散分析を用いて比較する。

【0096】

その処置期間がいずれであっても、R・ヒドロゲノトロフィカスの投与によって排出される水素の最大量(-50%～-80%)および排出速度(-60%～-80%)が対照群に比べて有意に低くなっている($P < 0.01$)。この処置が1、14、または28日後に有効であることが分かる(図1)。

【0097】

試験中、異なる時点で2群のラットの糞便の水素依存性酢酸生成細菌叢を計数する(Doret al, 1995)。R・ヒドロゲノトロフィカスを受けていない対照群では、酢酸生成群のレベルは時間に対しておよびドナーのものに比べて安定している、すなわち糞便g当たり約 $10^{6.8}$ 酢酸生成菌である。

【0098】

R・ヒドロゲノトロフィカスによる処置によって酢酸生成細菌叢のレベルが高まり、この後、このレベルは処置24時間の糞便g当たり $10^{7.5}$ に達する。試験終了までこのレベルが維持される。従って、処置ラットにおける酢酸生成細菌叢の増加はこれらの動物によって排出される H_2 量の減少と同時に起こっている。

【0099】

試験終了時にラットを安楽死により犠牲にし、解剖する。R・ヒドロゲノトロフィカスの投与により体重もしくは肝臓、腎臓および盲腸重量、または盲腸のpHに与える有意な影響はない($P < 0.05$)。同様に、R・ヒドロゲノトロフィカスで処置したラットの肝臓および腎臓の肉眼で見える外観は正常であり、対照ラットのものと同じである。

【0100】

b) ラクツロース投与後

この試験は上記と同じプロトコールに従って行う。ラクツロース(4-O-D-ガラクトピラノシル-D-フルクトース)(結腸内でのこの発酵によってガス容積の急激な増大が起こる)をラット当たり500mgの割合で胃挿管により投与し、その直後にそれらを呼吸チャンバーに置く。酢酸生成株での処置から1および14日後にR・ヒドロゲノトロフィカスがこの増大に与える影響を調べる。

【0101】

結腸内でガスが連続産生するこれらの条件下では、R・ヒドロゲノトロフィカスの投与によって排出される水素の最大量(-40%～-50%)および排出速度(-40%～-50%)が対照群に比べて有意に低くなっている($P < 0.05$)。この処置が1、または14日後に有効であることが分かる(図2)。

【0102】

この2つの試験では、R・ヒドロゲノトロフィカスで処置したラットに行動異常はなく、糞便の外観およびコンシステンシーは対照ラットのものと同じであった。

【0103】

使用する呼吸チャンバーは小動物を入れるケージが収容できる透明な硬質ポリビニル製、30リットル容の密閉独立チャンバーである。これらの呼吸チャンバーには実験隔離装置と連結可能な遮断移動用二重ドアが備わっている。

【0104】

この動物の細菌状態を保存するため、これらを滅菌した後に連結する。動物を隔離装置から呼吸チャンバーへ移動させた後、後者のものを隔離装置から外し、閉回路に接続する。ここでは蠕動ポンプを用いて空気を抗菌フィルターならびに CO_2 除去系(水酸化カリウム溶液を40%含有する吸収体)および水蒸気(シリカゲル結晶を含有する吸収体)に通過させる。空気中の O_2 含量をセンサーで測定し、電流測定電極、制御装置および電磁弁を用いて21%で一定に保つ。

【0105】

この装置により呼吸および直腸経路を介して排出される、結腸内での発酵に特異的なガス（水素、および適切であればメタン）の蓄積が可能になる。

【図面の簡単な説明】

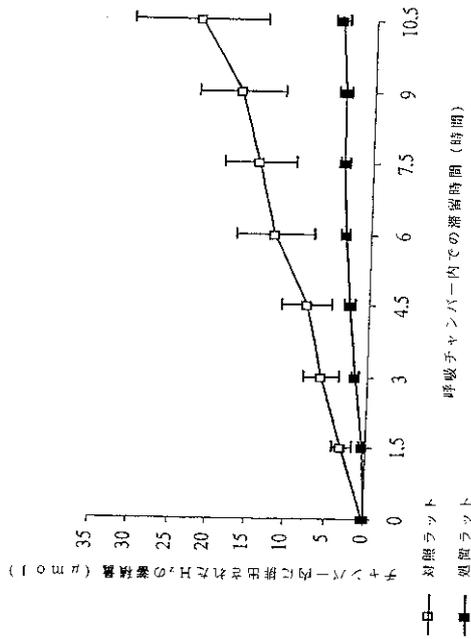
【図 1】

ラミノコッカス・ヒドロゲノトロフィカスでの14日間の処置による通常の栄養状態のヒト細菌叢保有ラットにより排泄される水素量への効果を示すグラフ。

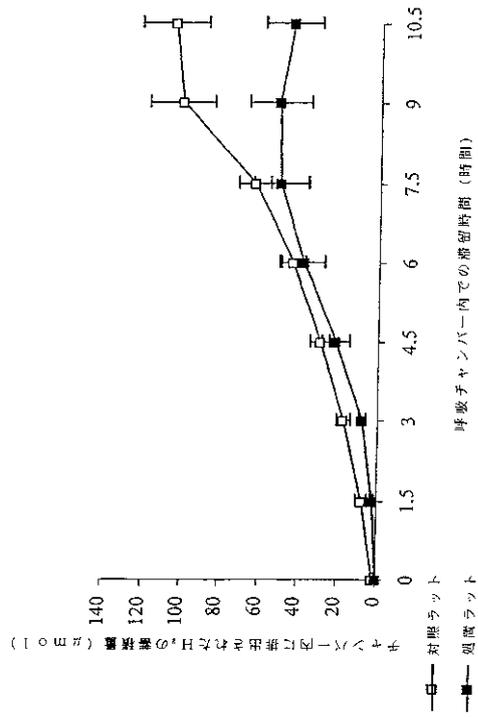
【図 2】

ラミノコッカス・ヒドロゲノトロフィカスでの14日間の処置によるラクツロース投与後のヒト細菌叢保有ラットにより排泄される水素量への効果を示すグラフ。

【図 1】



【図 2】



【国際公開パンフレット】

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau International(43) Date de la publication internationale
15 novembre 2001 (15.11.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/85187 A1

- (51) Classification internationale des brevets :
A61K 35/74, A61P 1/00, C12Q 1/68
- (21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR01/01426
- (22) Date de dépôt international : 11 mai 2001 (11.05.2001)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :
06/06089 11 mai 2000 (11.05.2000) FR
- (71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US)
: INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE (INRA) [FR/FR], 145, rue de l'Uni-
versité, F-75007 Paris (FR); DIGESTAR [FR/FR],
Biopôle Clermont Limagne, F 63360 Saint Beauvire
(FR).
- (72) Inventeurs et
(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : RENAUD,
Michel [FR/FR], 14, rue Paul Langavrin, F-63670 Le Cen-
dre (FR); BERNALIER, Anniek [FR/FR], 16, les Ormes,
F 63670 Laroche Blanche (FR).
- (74) Mandataires : MARTIN, Jean-Jacques etc., Cabinet
Regimbeau, 20, rue de Chazelles, F 75817 Paris Cedex 17
(FR).
- (81) États désignés (nationaux) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BH, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CY, CZ, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, NI, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TH, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) États désignés (régionaux) : brevet ARIPO (GL, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW); brevet eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE, TR); brevet OAPI (BF, BI, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publiée :
— avec rapport de recherche internationale
avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont
reçues
- En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT

(54) Titre : USE OF HYDROGENOTROPIC ACETOGENIC STRAINS FOR PREVENTING OR TREATING DIGESTIVE DIS-
ORDERSWO 01/85187 A1 (54) Titre : UTILISATION DE SOUCHES ACETOGENES HYDROGENOTROPES POUR LA PREVENTION OU LE TRAI-
TEMENT DE TROUBLES DIGESTIFS(57) Abstract: The invention concerns the use of non-pathogenic hydrogenotrophic acetogenic bacterial strains for preparing a com-
position for treating or preventing gastrointestinal disorders associated with productions of digestive gases and/or for modulating the
microbial balance of the digestive ecosystem in a mammal. The invention also concerns said pharmaceutical or food compositions,
and the methods for monitoring and preparing said strains.(57) Abrégé : La présente invention concerne l'utilisation de souches bactériennes acéto-gènes hydrogénéotrophes non pathogènes
pour la préparation d'une composition destinée au traitement ou à la prévention des troubles gastro-intestinaux associés aux pro-
ductions de gaz digestifs et/ou à moduler l'équilibre microbien de l'écosystème digestif chez un mammifère. L'invention concerne
également lesdites compositions pharmaceutiques ou alimentaires, ainsi que des procédés de suivi et de préparation desdites souches.

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

- 5 L'invention concerne l'utilisation de souches bactériennes acétogènes hydrogénéotrophes non pathogènes pour la préparation d'une composition destinée au traitement ou à la prévention des troubles gastro-intestinaux associés aux productions de gaz digestifs et/ou à moduler l'équilibre microbien de l'écosystème digestif chez un mammifère.
- 10 La prévalence des troubles digestifs fonctionnels ou colopathies fonctionnelles dans la population occidentale est très élevée puisque l'on estime qu'ils touchent environ 25% à 30% de la population adulte. De plus, ces troubles digestifs représentent une des causes majeures de consultation en gastro-entérologie (environ 50% des consultations). Les symptômes de ces troubles intestinaux sont
- 15 divers comme la modification du transit intestinal, le météorisme, les douleurs abdominales, le ballonnement. L'origine de ces troubles fonctionnels reste pour le moment mal définie mais l'on estime que les gaz produits lors de la digestion dans le côlon jouent un rôle important dans la genèse de certains symptômes comme l'excès de flatulences, la distension abdominale (ballonnement) et les douleurs
- 20 associées. Certains traitements ont été proposés comme le charbon actif, la siméthicone, la smectite, des antispasmodiques ainsi que certains compléments alimentaires à base de ferments (*Saccharomyces cerevisiae*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*), de plantes ou de fibres (oligofructose, fenouil, algues, avoine, agrumes...) ou de structure minérale (Octalite...). Ces traitements présentent
- 25 toutefois une faible efficacité sur les symptômes liés à la formation des gaz au niveau du côlon, et n'agissent pas de manière sélective. La présente invention se propose de remédier aux inconvénients de l'art antérieur, tant sur le plan du traitement que sur le plan de la prévention de l'inconfort digestif associé aux productions de gaz colique.
- 30 Pour ce faire, l'invention s'appuie à la fois sur les caractéristiques physiologiques des bactéries acétogènes hydrogénéotrophes, à savoir leur capacité à réduire le volume total des gaz fermentaires digestifs (H_2 et CO_2) et sur leur

diversité nutritionnelle qui leur confère un avantage écologique important dans l'écosystème digestif par rapport aux autres microorganismes hydrogénéotrophes.

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

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

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

Les archæa méthanogènes produisent du CH_4 qui est un gaz non toxique. Cette production de méthane n'est observée que chez une fraction de la population humaine (environ 21% des indiens adultes, 95% de la population rurale d'adolescents d'Afrique noire et 40% de la population occidentale) et son
25 élimination se fait par voie respiratoire et dans les flatulences (Segal et al. (1988) Gut 29 p608; Pochart et al. (1992) FEMS Microbiol. Lett. 98 p225). Ces individus, appelés méthano-excréteurs, hébergent une population d'archæa méthanogènes très importante ($>10^6/g$ d'extrait fécal sec) (Durand et al. (1996) in: Mälkki Y and Cummings JH (eds) Official Publications of the European Communities, p58). Chez
30 ces sujets, la méthanogénèse est la principale voie d'élimination de H_2 .

Les individus non méthano-excréteurs réutilisent H_2 par des mécanismes alternatifs, parmi lesquels l'acétogénèse réductrice. Cette voie constitue un processus métabolique majeur d'utilisation de H_2 chez les non méthano-excréteurs.

Des études ont en effet montré que la microflore fécale des sujets non méthano-excréteurs métabolise principalement H_2 et CO_2 en acétate, alors que celle des sujets méthano-excréteurs utilisent H_2 et CO_2 pour former du méthane (Lajoie et al. (1988) Appl. Environ. Microbiol. 54 p2733 ; Bernalier et al. (1996) FEMS Microbiol. Ecol. 19 p193). En parallèle, Doré et al. (1995 FEMS Microbiol. Ecol. 17 p279) ont montré l'existence d'une corrélation négative entre le nombre d'archaea méthanogènes et celui des bactéries acétogènes dans le côlon humain. Les individus non méthano-excréteurs hébergent donc peu ou pas d'archaea méthanogènes dans le côlon, ce qui permettrait une expression maximale de leur activité acétogène (Lajoie et al. (1988) Appl. Environ. Microbiol. 54 p2733 ; Bernalier et al. (1996) FEMS Microbiol. Ecol. 19 p193).

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

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

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

La présence simultanée de composés organiques et de H_2/CO_2 dans le milieu de culture (conditions équivalentes à celles rencontrées dans le côlon humain) peut se traduire par une utilisation simultanée des deux substrats par la souche acétogène

hydrogénotrophe (Breznak and Blum (1991), Arch. Microbiol., 156 p105). Ce phénomène appelé mixotrophie, permet à la bactérie d'avoir un rendement énergétique plus élevé et donc de croître plus rapidement.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

En particulier, l'invention concerne l'utilisation de souches acétogènes hydrogénotropes pour la préparation d'une composition pour les applications 25 suivantes :

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

30 Ce dernier point a pour intérêt :

- (1) de diminuer la formation du gaz CH₄,
- (2) de diminuer la production de H₂S, produit toxique, impliqué dans l'initiation et/ou le développement de pathologies digestives,

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

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

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

Ladite réduction et/ou ladite modulation s'effectue par la diminution du taux d'hydrogène gazeux (H₂) et/ou de dioxyde de carbone gazeux (CO₂) produit lors des fermentations digestives.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

L'invention concerne également un procédé de suivi spécifique de la souche bactérienne acétogène hydrogénotrophe non pathogène dans le tractus digestif d'un 25 mammifère, après son utilisation telle que définie ci-dessus, comprenant les étapes suivantes :

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

Afin de mettre en œuvre un tel procédé de suivi, on peut développer des trousse de diagnostic, qui sont également objets de la présente invention. De telles trousse contiennent en particulier un « étalon » afin de pouvoir évaluer la quantité de bactéries dans les fèces.

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

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

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

20 L'invention couvre également un procédé de production d'une souche bactérienne acétogène hydrogénotrophe non pathogène pour son utilisation telle que définie ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a. on effectue la croissance de la souche sur un milieu adapté, en
25 condition d'anaérobiose stricte, en présence d'un substrat carboné et/ou de H₂/CO₂ comme source d'énergie ;
- b. on récupère les cellules bactériennes ;
- c. on conditionne les cellules bactériennes suivant la forme galénique choisie.

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

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

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

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

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

DESCRIPTION DES FIGURES

Figure 1: Influence d'un traitement de 14 jours avec *Ruminococcus hydrogenotrophicus* sur les quantités d'hydrogène excrété par des rats à flore humaine en situation nutritionnelle normale.

Figure 2: Influence d'un traitement de 14 jours avec *Ruminococcus hydrogenotrophicus* sur les quantités d'hydrogène excrété par des rats à flore humaine après administration de lactulose

20 EXEMPLES

Exemple 1 : Isolement des micro-organismes

On utilise des échantillons fécaux humains provenant de volontaires sains, non méthano-excréteurs. Les individus sont considérés comme non méthano-excréteurs lorsque leur taux de méthane expiré n'exécède pas plus de 1 ppm celui de l'air ambiant qui est de 1,8 ppm (Bond et al. (1970) Gastroenterology 58 p 1035), et que le nombre de méthanogènes contenu dans leurs extraits fécaux est inférieur à 10^7 /g d'extrait fécal (Bernalier et al. (1996) Arch Microbiol. 166 p176). Le taux de méthane est déterminé à l'aide d'un chromatographe équipé d'un détecteur à ionisation de flamme. Les échantillons fécaux fraîchement prélevés sont conservés à 4°C sous anaérobiose stricte pendant 10 heures au maximum.

L'enrichissement, l'isolement et la culture des micro-organismes sont effectués sur un milieu semi-synthétique, le milieu AC-21 modifié (Breznak et al. (1988) Arch. Microbiol. 150 p282) sous anaérobiose stricte (Hungate (1969) in:

WO 01/85187

PCT/FR01/01426

11

Norris JR and Gibbons DW (eds) *Methods in microbiology* Vol. 3B, New-york: Academic Press p117). La composition par litre du milieu semi-synthétique est la suivante:

	KH ₂ PO ₄	0,2 g
5	NH ₄ Cl	0,25 g
	KCl	0,5 g
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,15 g
	MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,6 g
	Na ₂ SO ₄	0,1 g
10	Extrait de levure	0,5 g
	Tryptone	2 g
	Solution d'oligo-éléments	1 ml
	Solution Tungstate-Sélénium	0,1 ml
	Solution de vitamines	5 ml
15	Solution de Resazurine (1%, w/v)	1 ml
	NaHCO ₃ (1 M)	30 ml
	Solution réductrice Cystéine/Sulfure (1,25%/1,25%, w/v)	20 ml

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

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

Le milieu de dilution est un milieu anaérobie purement minéral (Doré et al. (1995) *FEMS Microbiol. Lett.* 130 p7). A partir d'un échantillon fécal, une suspension mère est réalisée (diluée au dixième, w/v). Une série de dilutions décimales est effectuée à partir de la suspension mère. Les dilutions ainsi réalisées
 30 sont inocuées dans le milieu semi-synthétique liquide contenant H₂/CO₂ (60: 40, v/v, 202kPa) comme seule source d'énergie (Doré et al. (1995) *FEMS Microbiol. Lett.* 130 p7 ; Bernalier et al. (1996) *FEMS Microbiol. Ecol.* 19 p193 ; Bernalier *et al.* (1996) *Curr. Microbiol.* 33 p94). Après incubation à 37 °C pendant 20 jours, les

- enrichissements sont obtenus à partir des tubes de dilution les plus élevées et présentant une croissance bactérienne, une consommation de gaz et une production stœchiométrique d'acétate les plus élevées (Bernalier et al. (1996) Curr. Microbiol. 33 p94). La diminution de la pression de gaz dans les cultures est déterminée par mesure directe de la pression partielle avec un manomètre de type Capshuefic (Dwyer, Instruments, Michigan City, Mich., USA). Après trois transferts des cultures enrichies, des colonies bactériennes sont isolées par la méthode des Roll-tubes (Hungate (1969) in: Norris JR and Gibbons DW (eds) Methods in microbiology Vol. 3B, New-york: Academic Press p117) contenant un milieu
- 10 homologue gélosé et H₂/CO₂ comme source d'énergie. Après 20 jours d'incubation à 39°C, les colonies sont transférées dans des milieux liquides. La purification des cultures est obtenue après 3 à 5 transferts successifs en Roll-tubes, au terme desquels la pureté des cultures est déterminée par microscopie à contraste de phase, après coloration de Gram.
- 15 L'ADN total des souches acétogènes hydrogénotrophes isolées est extrait par la méthode de Lawson et al (1989, FEMS Microbiol. Lett. 65 p41). Le gène codant pour l'ARN ribosomal 16S est ensuite amplifié par PCR à l'aide des primers universels ARI et pH. Les produits de PRC sont purifiés puis séquencés à l'aide d'un kit de séquence « Dye-Dideoxy Terminator cycle Sequence » et d'un séquenceur
- 20 automatique Applied Biosystem modèle 373A. La recherche d'homologie de séquence ARNr 16S entre les souches acétogènes isolées et les autres espèces est effectuée grâce au programme FASTA, les bases de données de séquences étant celles de l'EMBL et du RDP, et en utilisant les paramètres de base suggérés. Les alignements de séquence sont vérifiés manuellement.
- 25 Par cette méthode, une bactérie du genre *Ruminococcus* a pu être isolée et identifiée à l'espèce *Ruminococcus hydrogenotrophicus*. Cette bactérie a été déposée à la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Allemagne) sous le numéro DSM 10507, et également sous le numéro DSM 14294 le 10 mai 2001 (Traité de Budapest).
- 30 **Exemple 2 : Etude des caractères généraux**
- 1- Le type membranaire des bactéries est déterminé par coloration Gram (méthode conventionnelle) et par le test KOH d'après Buck (1982 App. Environ. Microbiol. 44 p992).

- 2- L'activité catalase est mesurée en mélangeant 1 ml de suspension bactérienne avec quelques gouttes de H_2O_2 (30%). La production de bulles de gaz se dégageant de façon plus ou moins intense indique la présence d'une catalase.
- 3- L'activité cytochrome oxydase est étudiée en plaçant une colonie bactérienne sur un disque de papier filtre saturé avec du diméthyl-p-phénylène diamine. Une coloration rouge pourpre survenant immédiatement sur le disque indique que le test est positif.
- 4- Les caractéristiques morphologiques des cultures sont étudiées par microscopie à contraste de phase et par microscopie électronique après coloration négative à l'uranyl-acétate 2%. Les cellules sont pré-fixées dans du glutaraldéhyde 2% (15 h à 4°C) puis fixées avec le OsO_4 2% (4°C, pendant 15 h au maximum). Les cellules sont ensuite incluses dans de l'EPPON-812 et les blocs sont très finement coupés. Ces coupes sont contrastées avec l'uranyl-acétate, trempées dans le sel d'acétate et observées à l'aide d'un microscope électronique à transmission (Philips 400).
- 5- Le type respiratoire des bactéries est étudié par détermination de la croissance en présence ou en absence de O_2 .
- 6- L'effet des variations de pH sur la croissance bactérienne est étudié en modifiant le ratio $CO_2/NaHCO_3$ du milieu semi-synthétique (Costilow (1981) American Society for Microbiology, Washington DC p66). Les mesures de la croissance bactérienne (DO600) sont réalisées après 24 ou 48 h d'incubation à 37°C. La recherche de la température optimale de croissance est effectuée sur milieu semi-synthétique contenant du glucose et la croissance est observée à des températures variant de 20 à 45°C. Chaque expérience est réalisée en triple. La croissance bactérienne est suivie à l'aide d'un spectrophotomètre, Spectronic 20D (Bioblock Scientific, Illkirch, France).

On a trouvé que *Ruminococcus hydrogenotrophicus* DSM 10507 est un coccobacille à Gram positif, non sporulé et anaérobie stricte. La coloration négative révèle l'absence de flagelles. Les cellules bactériennes sont isolées ou en paire. La souche ne possède pas de catalase ni de cytochrome oxydase. La température et le pH de croissance optimale sont respectivement de 35-37°C et 6,6. Les colonies sont translucides, de couleur blanche à légèrement brune avec des bords réguliers, circulaires et de diamètre variant entre 1 et 2 mm.

Exemple 3 : Test de croissance, détermination des activités acétogènes

L'aptitude de différentes souches bactériennes à métaboliser H_2/CO_2 et à former de l'acétate est étudiée. Les souches de *Ruminococcus hydrogenotrophicus* DSM 10507, ainsi que celles taxonomiquement proches *Ruminococcus productus* DSM 3507, *Ruminococcus productus* DSM 2950, *Ruminococcus hanseni* DSM 20583, et *Clostridium coccooides* DSM 935 (numéros DSM correspondant aux numéros des organismes déposés à la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen) sont incubées sur le milieu AC-21 modifié en présence de H_2/CO_2 (60: 40, v/v, 202 kPa) comme source d'énergie. Des cultures témoin sont incubées sous N_2/CO_2 (60: 40, v/v, 150 kPa). Trois cultures (1 témoin et 2 essais) sont effectuées pour chaque souche bactérienne. La croissance autotrophe est déterminée par incubation pendant 96 h en présence de H_2/CO_2 (60: 40, v/v, 202 kPa). La production d'acétate est mesurée par un test enzymatique (Boehringer Mannheim, Meylan, France), après 6 jours d'incubation à 37°C.

15 La consommation de H_2/CO_2 est mesurée

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

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

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

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

On observe que la souche bactérienne étudiée est acétogène : elle présente une croissance autotrophe en présence de H_2/CO_2 et produit de l'acétate comme métabolite majeur (Tableau I). Parmi les espèces taxonomiquement proches,

L'activité acétogène (i.e. consommation de H_2/CO_2 et production d'acétate) est retrouvée chez *C. coccoides* et beaucoup plus faiblement chez *R. hanseni* et *R. productus*.

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

10 **Tableau I** : Caractéristiques fermentaires des souches cultivées en présence de H_2/CO_2 ou de glucose comme seule source d'énergie

Propriétés	<i>R.</i>	<i>C.</i>	<i>R.</i>	<i>R.</i>	<i>R.</i>
	<i>hydrogenotrophicus</i> DSM 10507	<i>coccoides</i> DSM 935	<i>productus</i> DSM3507	<i>productus</i> DSM 2950	<i>hanseni</i> DSM 20853
Utilisation de H_2/CO_2	++	+	-	+	+/-
PF de H_2/CO_2					
Acétate	++	+	-	+	+/-
Propionate	-	-	-	-	-
Butyrate	-	-	-	-	-
Lactate	-	-	-	-	-
Succinate	-	-	-	-	-
Ethanol	-	-	-	-	-
PF du Glucose					
Acétate	++	+	++	++	++
Propionate	-	-	-	-	-
Butyrate	-	-	-	-	-
Lactate	+	-	-	-	+
Succinate	-	++	-	-	+
Ethanol	+	-	+	+	-

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

5 **Exemple 4 : Estimation de la capacité acétogène hydrogénotrophe de *R. hydrogenotrophicus* par mesure de l'incorporation de $^{13}\text{C}\text{O}_2$ dans l'acétate (méthode RMN)**

L'incorporation de $^{13}\text{C}\text{O}_2$ dans l'acétate est mesurée par RMN, à partir de suspensions cellulaires de *R. hydrogenotrophicus* incubées en présence de H_2 . Les
10 bactéries sont cultivées en fiole de 1 l contenant 250 ml de milieu AC21 tel que décrit dans l'exemple 1 et H_2/CO_2 comme seule source d'énergie. Après croissance à 37°C, les cellules bactériennes sont récupérées par centrifugation (12 000g pendant 20 minutes) et resuspendues dans un tampon phosphate contenant 20 mM de $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ (Leclerc et al (1997), *Anaerobe*, 3, p307). Les suspensions sont
15 incubées pendant 20 heures à 37°C, sous une atmosphère composée de 100% de N_2 (témoin) ou de H_2/N_2 (80/20, V/V), à 101 atm. En fin d'incubation, les suspensions sont à nouveau centrifugées à 12 000g pendant 20 minutes et les surnageants sont récupérés. La production totale d'acétate est mesurée par méthode enzymatique (kit Boehringer-Mannheim). Les métabolites marqués au ^{13}C sont analysés par RMN
20 (Bernalier et al, (1996), *FEMS Microbiol. Ecol.*, 19, p193).

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

Exemple 5 : Détermination des capacités nutritionnelles des bactéries acétogènes

30 Le métabolisme d'autres substrats organiques par les bactéries acétogènes est évalué en utilisant un milieu AC-21 modifié contenant 5 ou 10 mM de substrat, dans une atmosphère composée de CO_2 à 100%. Le test est considéré comme positif quand la bactérie maintient sa croissance après trois transferts successifs sur un

milieu contenant le même substrat, et si la DO_{600} de la culture est au moins égale au double de celle observée avec un milieu semi-synthétique basal (exempt de substrat organique), après 24 h d'incubation à 37°C.

On observe que de nombreux substrats organiques permettent la croissance 5 hétérotrophes des bactéries considérées (Tableau II).

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

Substrat	<i>R.</i>	<i>C.</i>	<i>R.</i>	<i>R.</i>	<i>R.</i>
	<i>hydrogenotrophicus</i>	<i>coccoides</i>	<i>productus</i>	<i>productus</i>	<i>hansenii</i>
	DSM 10307	DSM 935	DSM3507	DSM 2950	DSM 20853
Amidon	-	-	+	+	-
Amygdaline	-	+	+	+	+/-
Arabinose	-	+	+	+	-
Cellobiose	+	+	+	+	-
Fructose	+	+	+	+	-
Galactose	+	+	+	+	+
Inuline	-	-	-	-	+
Lactose	+	+	+	+	+
Maltose	+/-	+	+	+	+
Mannitol	-	+	+	+	-
Mannose	+	+	+	+	-
Melibiose	+/-	+	+	+	+
Raffinose	+	+	+	+	+
Rhamnose	-	+	-	-	-
Salicine	+	+	+	+	-
Sorbitol	-	+	+	+	-
Saccharose	-	+	+	+	-
Trehalose	+	+	+	+	+
Xylose	-	+	+	+	-

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

10 croissance.

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

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

La capacité de *R. hydrogenotrophicus* à utiliser 2 substrats organiques non digestibles par les enzymes de l'hôte, les fructo-oligosaccharides (FOS) et le lactulose est également déterminée selon le protocole décrit dans cet exemple [mesure la croissance bactérienne (densité optique à 600 nm) observée en présence de 2g/l de chacun des substrats indigestibles, et maintien de celle-ci après 3 transferts successifs sur le même substrat]. *R. hydrogenotrophicus* s'avère incapable de métaboliser ces 2 substrats.

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

Afin de déterminer si *R. hydrogenotrophicus* est capable de croître par mixotrophie (utilisation simultanée d'un substrat organique et d'un substrat inorganique), la souche est cultivée en présence de deux sources d'énergie, l'une organique, le glucose, et l'autre inorganique, H₂/CO₂. Le milieu de culture (milieu AC21 modifié comme décrit dans l'exemple 1) contient 1,4 mM de glucose et la phase gazeuse est remplacée, après ensemencement, par un mélange de H₂/CO₂ (60/40 à 156 kPa). Les cultures sont inoculées avec 0,3 ml d'une pré-culture de *R.*

hydrogenotrophicus obtenue soit avec le glucose soit avec H₂/CO₂ comme seule source d'énergie. Au cours de l'incubation à 37°C, la consommation de gaz par la souche est suivie à l'aide de capteurs de pression fixés aux bouchons des cultures (Leclerc et al. (1997), Anaerobe 3 p307). La croissance bactérienne est estimée par mesure de la densité optique des cultures à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Spectronic 20D. Des prélèvements de surnageants de cultures sont effectués toutes les 2 heures afin d'estimer la consommation de glucose (dosage du glucose restant par méthode enzymatique Boehringer) et la production de métabolites fermentaires par dosage chromatographique (comme décrit dans l'exemple 3).

10 *R. hydrogenotrophicus* s'avère capable de co-utiliser les deux substrats testés. Une seule phase exponentielle de croissance de la bactérie est observée en présence des deux substrats. Lors de cette phase exponentielle, une consommation simultanée du glucose et de H₂/CO₂ est observée. Ceci témoigne du caractère mixotrophe de *R. hydrogenotrophicus* à l'égard de ces 2 substrats (Leclerc et Bernalier, soumis pour publication). En fin de phase exponentielle, le glucose est
15 totalement consommé par la bactérie, celle-ci maintient alors son métabolisme en phase stationnaire de croissance, par l'utilisation de H₂/CO₂ restant.

La capacité de *R. hydrogenotrophicus* à co-métaboliser un édulcorant, le fructose, et H₂/CO₂, est également étudiée. La souche est cultivée sur le milieu AC21, comme décrit dans l'exemple 1, en présence de ces deux sources d'énergie.
20 Différentes concentrations en fructose sont testées (2, 1, 0.5 et 0.25 g/l), la phase gazeuse restant composée de H₂/CO₂ (60/40, v/v, 202 kPa). Le protocole expérimental utilisé ensuite est le même que celui décrit plus haut.

R. hydrogenotrophicus s'avère capable de co-métaboliser le fructose et H₂/CO₂, la croissance de la bactérie étant caractérisée par une seule phase exponentielle de croissance en présence des deux substrats. Cette croissance mixotrophe est observée quelle que soit la concentration en fructose présente dans le milieu de culture et quelle que soit l'origine de l'inoculum bactérien (préculture réalisée sur fructose ou H₂/CO₂ ou fructose + H₂/CO₂). En phase stationnaire de
25 croissance, la bactérie métabolise H₂/CO₂ uniquement, la totalité du fructose ayant été consommé.
30

Exemple 7 : Effet de la lyophilisation des cultures de *Ruminococcus hydrogenotrophicus* sur l'expression de l'activité hydrogénéotrophe

Afin de déterminer si la conservation de *R. hydrogenotrophicus* sous forme lyophilisée peut altérer sa capacité à utiliser H_2/CO_2 , différentes conditions de culture, de conservations des lyophilisats, et de re-suspensions de la bactérie sont testées.

Des cultures de *R. hydrogenotrophicus* sont réalisées en fiole de 11 contenant 250 ml de milieu AC21 comme décrit dans l'exemple 1, avec du fructose (2 g/l), H_2/CO_2 (60/40, v/v, 100 kPa) ou les 2 substrats comme source d'énergie. Ces cultures sont incubées à 37°C pendant 24h, 48h ou 72h selon le(s) substrat(s) utilisé(s). Des culots bactériens sont ensuite obtenus par centrifugation (15 300 x g, 30 min, 4°C) des cultures et sont repris dans 10 ml de tampon anaérobie. Les suspensions ainsi obtenues sont aliquotées par 2 ml puis centrifugées 5 min à 14 000 x g. Les culots bactériens sont alors congelés à -80°C avant d'être lyophilisés pendant 1 nuit. Les lyophilisats sont conservés à 4°C sous atmosphère aérobie ou anaérobie (100% de CO_2). Après 15 à 30 jours de conservation, les lyophilisats de *R. hydrogenotrophicus* sont repris dans 5 ml de tampon de dilution anaérobie. Ces suspensions bactériennes sont alorsensemencées dans un milieu AC21 contenant H_2/CO_2 (60/40, v/v, 200 kPa) comme seule source d'énergie soit directement soit après enrichissement pendant 48h à 37°C, dans un milieu de culture complexe contenant diverses sources de carbones. Après 72h d'incubation à 37°C en présence de H_2/CO_2 , la consommation de H_2 et la quantité d'acétate produite sont déterminées pour chaque culture.

La lyophilisation de *R. hydrogenotrophicus* ne semble pas affecter son potentiel hydrogénéotrophe. En effet, quel que soit le substrat utilisé pour précultiver la souche (fructose, H_2/CO_2 ou les 2 substrats simultanément), l'activité hydrogénéotrophe de *R. hydrogenotrophicus* est restituée lors de la mise en culture des lyophilisats. De même, le mode de conservation aérobie ou anaérobie du lyophilisat influence peu l'expression du potentiel hydrogénéotrophe de la bactérie. Toutefois, une activité hydrogénéotrophe maximale est observée lorsque *R. hydrogenotrophicus* est pré-cultivée en présence de fructose et que le lyophilisat est conservée sous atmosphère anaérobie. De même, la culture préalable des bactéries lyophilisées sur un milieu riche en substrats organiques augmente sensiblement

L'expression de leur potentiel hydrogénéotrophe, quel que soit le substrat utilisé pour pré-cultiver la souche et le mode de conservation du lyophilisat. Cet effet s'explique vraisemblablement par l'augmentation de la densité bactérienne engendrée par l'enrichissement des cultures lyophilisées sur milieu complexe.

5 L'ensemble des résultats obtenus démontrent que la souche de *R. hydrogenotrophicus* peut être cultivée en présence de substrat organique puis conservée à 4°C sous forme lyophilisée en atmosphère aérobie ou anaérobie, sans que cela n'affecte sensiblement l'expression ultérieure de son potentiel hydrogénéotrophe.

10

Exemple 8 : Transfert inter-espèces de H₂, *in vitro*, entre bactéries fibrolytiques productrices de H₂ et *R. hydrogenotrophicus*.

La capacité de *R. hydrogenotrophicus* à utiliser l'H₂ produit par des espèces bactériennes fibrolytiques est étudiée *in vitro*, dans des cocultures associant la souche acétogène à une bactérie cellulolytique. Les deux espèces cellulolytiques 15 étudiées ont été isolées au laboratoire à partir de selles humaines. Les cocultures sont réalisées sur un milieu semi-synthétique, mis au point au laboratoire, contenant une bandelette de cellulose de papier filtre Whatman n°1 comme seule source de carbone et d'énergie. Chacune des espèces cellulolytiques estensemencée à raison 20 de 0,5 ml d'inoculum par tube de culture. Après 48h d'incubation à 37°C, 0,5 ml d'inoculum de *R. hydrogenotrophicus* est additionné à chacune de ces cultures de bactéries cellulolytiques. Des monocultures témoins de chaque espèce cellulolytique sont effectuées parallèlement.

Une cinétique est réalisée par incubation des cultures à 37°C pendant 12 25 jours. Après incubation, la quantité de H₂ dans la phase gazeuse est analysée par chromatographie, la quantité de cellulose dégradée est estimée par mesure de la matière sèche restante et les produits finaux de fermentation de la cellulose sont déterminés par chromatographie en phase gazeuse et/ou par voies enzymatiques (kit Roche).

30 L'addition de *R. hydrogenotrophicus* à l'une ou l'autre des espèces cellulolytiques productrices de H₂ se traduit par une forte diminution de ce gaz dans les co-cultures alors qu'il s'accumule dans la phase gazeuse des monocultures.

R. hydrogenotrophicus est donc capable de ré-utiliser efficacement l'H₂ produit *in vitro* par une espèce fibrolytique lors de la fermentation de la cellulose. Ce transfert de H₂ entre *R. hydrogenotrophicus* et les espèces cellulolytiques n'entraîne que peu ou pas de modification de l'activité cellulolytique des espèces
5 fibrolytiques étudiées. En revanche, la cellulose est majoritairement fermentée en acétate dans les cocultures alors qu'elle est plutôt de type acide-mixte dans les mono-cultures (productions d'acétate, de succinate ou d'éthanol et de lactate).

Exemple 9 : Capacité de la souche acétogène hydrogénéotrophe
10 *Ruminococcus hydrogenotrophicus* à réduire le volume des gaz coliques *in vivo*, chez le rat à flore humaine.

Afin de déterminer si *R. hydrogenotrophicus* est capable de réduire le volume des gaz dans le côlon en présence d'une flore digestive complexe, *R. hydrogenotrophicus* est administré par voie orale à des rats à flore humaine et
15 l'évolution du volume de gaz colique est suivie en mesurant l'hydrogène excrété par les voies respiratoire et rectale.

L'effet de *R. hydrogenotrophicus* est étudié en situation nutritionnelle normale et après administration d'un substrat fermentescible (lactulose) provoquant une augmentation brutale du volume de gaz dans le côlon.

20 Les animaux utilisés sont des rats Fischer 344 mâles, âgés de 3 mois en début d'expérience. Nés sans germe, ils sont inoculés *per os* avec 1ml d'une suspension centésimale de matières fécales humaines fraîches provenant d'un donneur adulte, non méthanogène et ayant un régime alimentaire de type occidental. L'inoculation a lieu 2 semaines avant le début de l'expérience. Les rats sont
25 hébergés dans des isolateurs et reçoivent une alimentation semi-synthétique "de type humain" (protéines et lipides d'origines animale et végétale; glucides simples et complexes crus et cuits), stérilisée par irradiation γ à 45 kGy. Aliment et eau de boisson sont distribués *ad libitum*.

30 a) Situation nutritionnelle normale

L'expérience est réalisée avec 16 rats à flore humaine divisés en 2 groupes de 8, un groupe témoin et un groupe traité. Les rats du groupe traité reçoivent chaque matin pendant 28 jours, par intubation gastrique, une dose de 10⁸ à 10⁹

bactéries sous forme de 1 ml d'une culture de *R. hydrogenotrophicus* cultivée pendant 18h sur milieu AC21 (comme décrit dans l'exemple 1) glucosé (2 g/l). Le groupe témoin reçoit dans les mêmes conditions 1 ml de milieu AC21 glucosé stérile.

5 Après 1, 14 et 28 jours de traitement, les rats des 2 groupes sont placés pendant 12h dans des chambres respiratoires individuelles permettant la mesure de l'hydrogène excrété par voies respiratoire et rectale (voir la description des chambres respiratoires ci-après). Des échantillons d'air sont prélevés en double dans les chambres respiratoires entre 0h et 12h. La concentration en hydrogène est
10 immédiatement déterminée par chromatographie en phase gazeuse. Les résultats des groupes témoin et traité sont comparés à l'aide d'une ANOVA pour mesures répétées.

Quelle que soit sa durée du traitement, l'administration de *R. hydrogenotrophicus* diminue significativement la quantité maximale d'hydrogène
15 excrétée (-50% à -80%) et la vitesse d'excrétion (-60% à -80%) par rapport au groupe témoin ($P < 0,01$). Le traitement s'avère aussi efficace après 1, 14 ou 28 jours (figure 1).

La flore acétogène hydrogénéotrophe est dénombrée (Doré et al, 1995) dans les fèces des rats des deux groupes, à différents temps au cours de l'expérience.
20 Dans le groupe témoin ne recevant pas *R. hydrogenotrophicus*, le niveau de la population acétogène est stable au cours du temps et comparable à celui du donneur soit environ log 6.8 acétogènes par g de fèces.

Le traitement avec *R. hydrogenotrophicus* entraîne une augmentation du niveau de la flore acétogène qui atteint alors log 7.5 /g de fèces dès 24h de
25 traitement. Ce niveau se maintient jusqu'à la fin de l'expérience. L'augmentation de la flore acétogène chez les rats traités coïncide donc avec la diminution des quantités de H₂ excrété par ces animaux.

En fin d'expérience, les rats sont euthanasiés et autopsiés. L'administration de *R. hydrogenotrophicus* n'a pas d'effet significatif ni sur le poids corporel, ni sur
30 le poids du foie, des reins et du caecum, ni sur le pH caecal ($P > 0,05$). De même l'aspect macroscopique du foie et des reins des rats traités avec *R. hydrogenotrophicus* est normal et identique à celui des rats témoins.

b) Après administration de lactulose

Cette expérience est réalisée selon le même protocole que précédemment. Le lactulose (4-O-β-D-galactopyranosyl-D-fructose), dont la fermentation dans le cœlon entraîne une augmentation brutale du volume de gaz, est administré par
5 intubation gastrique, à raison de 500 mg par rat, juste avant leur passage en chambre respiratoire. L'effet de *R. hydrogenotrophicus* sur cette augmentation est examiné après 1 et 14 jours de traitement avec la souche acétogène.

Dans ces conditions de productions excessives de gaz coliques, l'administration de *R. hydrogenotrophicus* diminue significativement la quantité
10 maximale d'hydrogène excrétée (-40% à -50%) et la vitesse d'excrétion (-40% à -50%) par rapport au groupe témoin ($P < 0,05$). Le traitement s'avère aussi efficace après 1 ou 14 jours (figure 2).

Dans les 2 expériences, les rats traités avec *R. hydrogenotrophicus* n'ont
15 manifesté aucune anomalie de comportement et l'aspect et la consistance des fèces étaient identiques à ceux des rats témoins.

Les chambres respiratoires utilisées sont des enceintes autonomes étanches en polyvinyle rigide transparent, d'un volume de 30 litres, permettant d'héberger une
20 cage contenant un animal de petite taille. Elles sont munies d'une double porte de transfert étanche (DFTÉ) permettant de les connecter aux isolateurs d'expérience.

Afin de préserver le statut bactérien des animaux, elles sont stérilisées avant connexion. Après transfert de l'animal de l'isolateur dans la chambre respiratoire, celle-ci est détachée de l'isolateur et connectée à un circuit fermé dans lequel l'air
25 est poussé à l'aide d'une pompe péristaltique à travers des filtres anti-bactériens et des systèmes d'élimination du CO₂ (absorbeur contenant une solution de potasse à 40%) et de la vapeur d'eau (absorbeur contenant des cristaux de silicagel). La teneur en O₂ de l'air est mesurée par une sonde et maintenue constante à 21% à l'aide d'une électrode ampérométrique, d'un régulateur et d'une électrovanne.

Ce dispositif permet l'accumulation des gaz spécifiques des fermentations
30 coliques (hydrogène et, le cas échéant, méthane), excrétés par voies respiratoire et rectale.

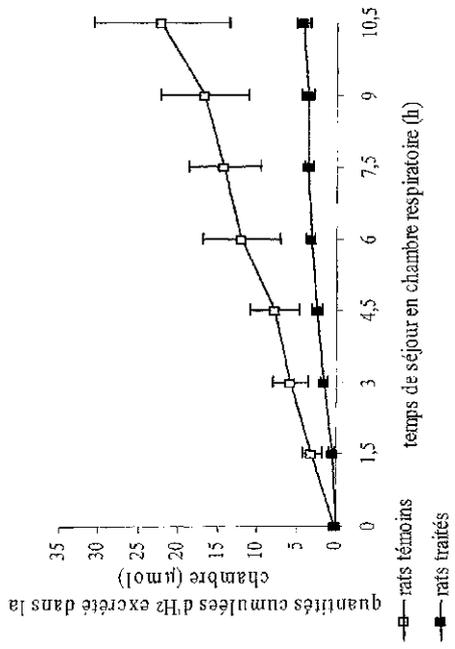


Fig. 1

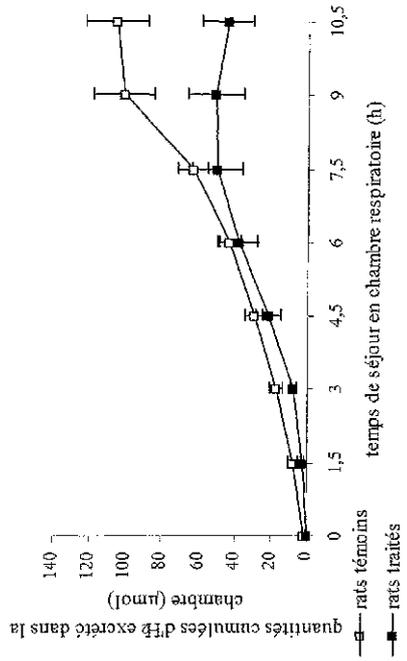


Fig. 2

【国際調査報告】

WO 01/85187

PCT/FR01/01426

25

Revendications

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

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

19. Procédé de production d'une souche bactérienne acétogène hydrogénéotrophe non pathogène pour une utilisation selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
- 5 a. on effectue la croissance de la souche sur un milieu adapté, en condition d'anaérobiose stricte, en présence d'un substrat carboné et/ou de H_2/CO_2 comme source d'énergie ;
- b. on récupère les cellules bactériennes ;
- c. on conditionne les cellules bactériennes suivant la forme galénique choisie.
- 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/FR 01/01426

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K35/74 A61FL/00 C12Q1/68	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC	
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K C12Q	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched	
Electronic data bases consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE, FSTA, CHEM ABS Data, EMBASE, SCISEARCH	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category*	Relevance to claim No.
X	1
X	18,19
A	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are identified in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.	
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claims or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (see specification) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 27 August 2001	Date of mailing of the international search report 03/09/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5516, Patentstrasse 1, CH-8001, Zurich, Switzerland Tel (+41-76) 340 2541, Tx. 31 651 400 01, Fax (+41-76) 340 2500	Authorized officer Teyssier, B

1

Form PCT/ISA210 (provisional) July 1999

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/FR 01/01426

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document with indication why it is appropriate of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KELLER G H & MANAK M M: "DNA Probes" 1994, STOCKTON PRESS, NEW YORK XP002158943 208660 page 594 -page 596 * Procedure 15.2 *	18
A	BERNALIER A ET AL: "Acetogenesis from H-2 and CO-2 by methane- and non-methane-producing human colonic bacterial communities." FEMS MICROBIOLOGY ECOLOGY, vol. 19, no. 3, 1996, pages 193-202, XP000979130 cited in the application	
A	DURAND M & BERNALIER A: "Reductive acetogenesis in animal and human gut." PHYSIOLOGICAL AND CLINICAL ASPECTS OF SHORT-CHAIN FATTY ACIDS, 1995, pages 107-117, XP000979817 Cambridge University Press ISBN: 0-521-44048-3	
A	VAN NEVEL C J & DEMEYER D I: "Control of rumen methanogenesis." ENVIRONMENTAL MONITORING AND ASSESSMENT, vol. 42, 1996, pages 73-97, XP000979267	

1

Form PCT/EA/210 (Specification of second group) (July 1992)

page 2 of 2

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 01/01426

<p>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 A61K35/74 A61P1/00 C12Q1/68</p>		
<p>Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB</p>		
<p>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification et/ou des symboles de classement) CIB 7 A61K C12Q</p>		
<p>Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche</p>		
<p>Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, l'entité de recherche utilisée) EPO-Internal, MPI Data, BIOSIS, MEDLINE, FSTA, CHEM ABS Data, EMBASE, SCISEARCH</p>		
<p>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</p>		
<p>Catégorie*</p>	<p>Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents</p>	
	<p>no. de revendications visées</p>	
X	<p>JOBLIN K N: "Ruminal acetogens and their potential to lower ruminant methane emissions." AUSTRALIAN JOURNAL OF AGRICULTURAL RESEARCH, vol. 50, no. 8, 1999, pages 1307-1313, XP001010439 le document en entier</p>	1
X	<p>BERNALIER A ET AL: "Ruminococcus hydrogenotrophicus sp. nov., a new H₂/CO₂-utilizing acetogenic bacterium isolated from human feces." ARCHIVES OF MICROBIOLOGY, vol. 166, no. 3, 1996, pages 176-183, XP000979148 le document en entier</p>	18,19
A		
<p><input checked="" type="checkbox"/> Voir le suite du rapport pour le le de la liste des documents <input type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe</p>		
<p>* Catégories spéciales de documents cités</p>		
<p>A* document qui détermine l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p>	<p>T* document utilisé après la date de dépôt international, en la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comparaison le principe ou la théorie constituant le base de l'invention</p>	
<p>B* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p>	<p>X* document particulièrement pertinent: l'inventeur revendiqué ne peut être considéré comme innovateur ou inventeur impléant une invention nouvelle par rapport au document considéré</p>	
<p>C* document pouvant être en doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication et/ou autre citation ou pour une raison spéciale (elle est indiquée)</p>	<p>Y* document particulièrement pertinent: l'inventeur revendiqué ne peut être considéré comme impléant une invention nouvelle lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p>	
<p>D* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tout autres moyens</p>	<p>Z* document qui fait partie de la même famille de brevets</p>	
<p>E* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p>		
<p>Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée</p>	<p>Date d'émission du présent rapport de recherche internationale</p>	
<p>27 août 2001</p>	<p>03/09/2001</p>	
<p>Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Français des Brevets, P.O. 5618 Palatinan 2 CS - 52251 FR Nanterre Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 051 epo nl Fax: (+31-70) 340-0910</p>	<p>Fonctionnaire autorisé Teyssier, B</p>	

1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 01/01426

C/autre DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des renvois/citations visées
X	KELLER G H & MANAK M M: "DNA Probes" 1994, STOCKTON PRESS, NEW YORK XP002158943 208660 page 594 -page 596 * Procedure 15.2 *	18
A	BERNALIER A ET AL: "Acetogenesis from H-2 and CO-2 by methane- and non-methane-producing human colonic bacterial communities." FEMS MICROBIOLOGY ECOLOGY, vol. 19, no. 3, 1996, pages 193-202, XP000979130 cité dans la demande	
A	DURAND M & BERNALIER A: "Reductive acetogenesis in animal and human gut." PHYSIOLOGICAL AND CLINICAL ASPECTS OF SHORT-CHAIN FATTY ACIDS, 1995, pages 107-117, XP000979817 Cambridge University Press ISBN: 0-521-44048-3	
A	VAN NEVEL C J & DEMEYER D I: "Control of rumen methanogenesis." ENVIRONMENTAL MONITORING AND ASSESSMENT, vol. 42, 1996, pages 73-97, XP000979267	

1

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(74)代理人 100107342

弁理士 横田 修孝

(72)発明者 ミシェル、ルノー

フランス国ル、サンドル、リュ、ポール、ランジュバン、14

(72)発明者 アニク、ベルナリエ

フランス国ラロシュ ブランシュ、レ、ゾルム、16

Fターム(参考) 4B018 MD85 ME11

4B063 QA13 QA18 QQ03 QQ42 QR32 QR55 QS34

4B065 AA01X BC05 CA10 CA44

4C087 AA01 AA02 BC55 BC61 BC68 MA02 MA52 MA60 ZA68