BACTERIE DE LA FAMILLE DES *CHRISTENSENELLACÉES* DANS LA PREVENTION ET/OU LE TRAITEMENT DE MALADIES INFLAMMATOIRES CHRONIQUES ET/OU DE MALADIES GASTRO-INTESTINALES INFLAMMATOIRES ET/OU DE CANCERS

[0001] L'invention concerne la prévention et le traitement des maladies inflammatoires chroniques, des maladies gastro-intestinales inflammatoires et/ou des cancers avec des bactéries spécifiques du microbiote intestinal et des compositions les contenants.

[0002] L'inflammation est le processus normal de défense de l'organisme face à une agression. Elle permet de lutter et d'éliminer le ou les agents étrangers à l'origine de ladite agression. Cette inflammation, dite aiguë, est réversible et n'a qu'une durée limitée allant de quelques minutes à quelques jours. Toutefois, dans certains cas, le processus inflammatoire se dérègle et l'inflammation devient chronique. Au lieu de contribuer à la défense de l'organisme, les acteurs impliqués dans le processus inflammatoire deviennent dangereux et entraînent un état pathologique souvent grave et invalidant. Les maladies inflammatoires chroniques sont donc des maladies dont la physiopathologie est directement liée à une inflammation, ladite inflammation étant d'origine auto-immune et/ou auto-inflammatoire.

[0003] Tous les organes peuvent être concernés par une inflammation chronique, comme par exemple le système digestif (maladie de Crohn, colite ulcéreuse, gastrite auto-immune, etc.), le foie (hépatite, NAFLD, stéatohépatite non alcoolique, etc.), le pancréas (pancréatite), les poumons (asthme), la peau (dermatite atopique comme le psoriasis), le système nerveux (scléroses en plaques), les articulations (polyarthrites). Par ailleurs, l'inflammation chronique est également présente dans d'autres situations où d'autres mécanismes sont en cause comme en particulier les cancers.

[0004] L'inflammation chronique, et en particulier les maladies chroniques inflammatoires, touchent une large portion de la population, dans des proportions variées en fonction de la pathologie concernée. Les conséquences pour la santé sont majeures, car ces maladies, bien qu'à évolution lente, sont invalidantes, douloureuses et associées à un risque élevé de mortalité précoce.

[0005] Actuellement, les traitements proposés pour ces maladies sont des anti-inflammatoires, des immunomodulateurs et/ou immunosuppresseurs. On peut citer par exemple :

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

[0006] Tous ces médicaments ont des taux de réponses très variables du fait de la dégradation des molécules lorsqu'elles sont administrées et présentent des effets secondaires importants. De plus, les immunomodulateurs entravent la réponse immunitaire normale et saine face aux pathogènes, si bien que les patients traités sont susceptibles aux infections. Le méthotrexate quant à lui est spécifiquement connu pour ses effets indésirables sur la production de sperme et par conséquent sur la fertilité. Ainsi, la plupart de ces maladies inflammatoires restent sans traitement ou sans traitement adéquat.

[0007] Par conséquent, l'étude et la recherche de nouvelles stratégies de traitement anti-inflammatoire constituent un sujet majeur en médecine et en recherche biomédicale, en particulier le développement d'un traitement efficace des maladies chroniques inflammatoires, des maladies gastro-intestinales et des maladies induites par une inflammation chronique, qui soit facile à administrer et qui ne présente pas d'effets secondaires.

[0008] C'est l'objectif de la présente invention, qui, pour y répondre, vise l'utilisation de bactéries particulières du microbiote intestinal humain, à savoir des bactéries de la famille des *Christensenellacées*, préférentiellement du genre *Christensenella*. Ces bactéries peuvent être éventuellement combinées à d'autres bactéries et notamment des bactéries de l'espèce *Akkermansia muciniphila*.

[0009] Des bactéries de la famille des *Christensenellacées*, notamment du genre *Christensenella*, ont déjà été étudiées et décrites. C'est le cas en particulier de *Christensenella minuta*, *Christensenella massiliensis* et *Christensenella timonensis*. *Christensenella minuta* en particulier a été décrite pour la première fois en 2012. En 2014, une étude a montré qu'il s'agissait du taxon le plus héritable dans une cohorte de jumeaux britanniques et que leur présence est associée à un indice de masse corporel faible. Cette corrélation entre

Christensenella minuta et l'indice de masse corporel faible a ensuite été observée dans une dizaine d'études parues depuis 2014 dans des populations géographiquement diverses.

[0010] Il a été décrit dans la demande WO2016/156527 l'intérêt de rétablir une population minimale en *Christensenella* chez des individus présentant une maladie inflammatoire intestinale liée à une déficience en *Christensenella* dans le microbiote intestinal. Toutefois, aucune des bactéries précitées n'a démontré de lien direct avec ces pathologies chez l'homme.

[0011] Par ailleurs, les demandes WO2018/162738 et WO2018/162726 enseignent que l'utilisation de bactéries particulières de la famille *Christensenellacées*, appartenant à des espèces définies comme étant spécifiquement éloignées de celles du genre *Christensenella* et notamment des espèces *Christensenella minuta* et *Christensenella timonensis*, permettent de lutter notamment contre le surpoids et l'obésité, en intervenant par exemple sur la présence de gras viscéral et sur la perméabilité intestinale.

[0012] *Akkermansia muciniphila*, appartenant à la famille *Verrucomicrobiaceae* et au genre *Akkermansia*, est une bactérie identifiée pour la première fois en 2004 et qui représente environ 1 à 3 % en nombre sur le total des genres bactériens du microbiote intestinal d'adultes en bonne santé (Derrien *et al.*, 2004, 54: 1469- 1476; Derrien *et al.* Applied Environmental Microbiology 2008, 74, 1646-1648).

[0013] La population en nombre d'*Akkermansia muciniphila* a déjà été rapportée comme étant réduite dans les échantillons de selles d'individus obèses et de patients atteints d'une maladie gastro-intestinale inflammatoire (Png, *et al.* Gastroenterol. 2010;105: 2420-2428). *Akkermansia muciniphila* est associé à un état métabolique plus sain et à de meilleurs résultats cliniques après une intervention de restriction calorique chez les adultes en surpoids voire obèses.

[0014] De façon surprenante, et selon l'invention, les bactéries du genre *Christensenella*, et notamment les espèces *Christensenella minuta, Christensenella massiliensis et Christensenella timonensis*, lorsqu'elles sont administrées à l'homme ou à l'animal, sont capables d'agir sur les marqueurs de l'inflammation à l'origine des maladies inflammatoires, en particulier des maladies gastro-intestinales inflammatoires et maladies chroniques inflammatoires ; et des cancers. En outre, les inventeurs, inopinément ont déterminé des propriétés anti-inflammatoires synergiques issues de la mise en œuvre d'une bactérie du genre *Christensenella* en association avec une bactérie du genre *Akkermansia*, en particulier

Akkermansia muciniphila, un probiotique de nouvelle génération (NGP) bien connu issu de la famille *Verrucomicrobiaceae*.

[0015] C'est pourquoi, l'invention a pour objet une bactérie du genre *Christensenella,* pour son utilisation dans la prévention et/ou le traitement de maladies inflammatoires chroniques et/ou des maladies gastro-intestinales inflammatoires et/ou de cancers chez l'être humain ou l'animal.

[0016] Avantageusement, une telle bactérie, lorsqu'elle est administrée à un être humain ou un animal présentant une inflammation chronique, est capable d'agir sur les molécules produites en excès lors d'une inflammation chronique comme la kynurenine, l'interleukine 6, l'interleukine 8, le TNFalpha, l'interleukine 1b, les lipocalines ou la calprotectine fécale, et/ou en stimulant la production de la cytokine anti-inflammatoire interleukine 10.

[0017] L'invention a également pour objet les compositions comprenant au moins une bactérie du genre *Christensenella,* seule ou en association avec au moins une bactérie additionnelle, préférentiellement au moins une bactérie additionnelle du genre *Akkermansia*, pour son utilisation dans la prévention et/ou le traitement de maladies inflammatoires chroniques et/ou des maladies gastro-intestinales inflammatoires et/ou de cancers chez l'être humain ou l'animal.

[0018] Une telle composition comprenant, dans un milieu physiologiquement acceptable, au moins l'une de ces bactéries (au moins une bactérie du genre *Christensenella* seule ou en association avec au moins une bactérie additionnelle du genre *Akkermansia*) et/ou leur surnageant, est également visée *per se*.

[0019] D'autres caractéristiques et avantages ressortiront de la description détaillée et des figures de l'invention qui va suivre.

[0020] **BREVE DESCRIPTION DES DESSINS**

[0021] La Figure 1 représente la production d'interleukine-8 (IL-8) (en pg/mL) (ordonnée) dans des cellules HT-29 stimulées par du TNF-α en présence de souches de *Christensenella minuta*, *Christensenella timonensis, Akkermansia municiphila, Christensenella minuta* + *Akkermansia municiphila* et *Christensenella timonensis* + *Akkermansia municiphila* (abscisse).

[0022] La Figure 2 représente la sécrétion de l'IL-8 par les cellules intestinales de la lignée HT29 après co-incubation en présence de surnageants de souches de *Christensenella minuta (*DSMZ: DSM22607) et stimulation par le TNF- α. Test statistique non paramétrique de Dunn:

*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001. IL-8 : Interleukine 8; TNF- α : Tumor Necrosis Factor alpha. Moyennes de 4 expériences répétées en triplicats.

[0023] La Figure 3 représente la mesure de la résistance trans-épithéliale sur des cellules intestinales de la lignée Caco-2 après co-incubation en présence bactéries *Christensenella minuta (*DSMZ: DSM22607) et après stimulation par le TNF- α. Test statistique non paramétrique de Dunn: *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001. IL-8 : Interleukine 8; TNF-a : Tumor Necrosis Factor alpha. Moyennes de 3 expériences répétées en triplicats.

[0024] La Figure 4 représente les effets de *Christensenella minuta* (DSM 22607) sur un modèle d'inflammation induit par le DNBS. (A) Suivi de la perte de poids des groupes traités à partir du jour de l'injection (J0). (B) Diminution significative des scores macroscopiques indiquant une réduction de la sévérité de l'inflammation suite aux traitements DSM 22607 et 5ASA. Effets immunomodulateurs de DSM22607 à travers la diminution de l'activité de la myélopéroxydase (C) et de l'augmentation de l'interleukine-10 (IL-10), une cytokine anti-inflammatoire, dans la rate (D). ANOVA non paramétrique suivie par un test statistique de Dunn : *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001. DNBS : Dinitrobenzene sulfonic acid.

[0025] La Figure 5 démontre la généralisation des effets anti-inflammatoires des espèces de *Christensenella minuta* sur un modèle d'inflammation induite par le DNBS. (A) Réduction des scores macroscopiques indiquant une réduction de la sévérité de l'inflammation suite aux traitements avec différentes espèces de *Christensenella minuta*. (B) Effets immunomodulateurs de différentes espèces de *Christensenella minuta* à travers la diminution de l'activité de la myélopéroxydase (C). ANOVA non paramétrique suivie par un test statistique de Dunn : *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001. DNBS : Dinitrobenzene sulfonic acid.

[0026] La Figure 6 représente l'effet des surnageants des souches de *Christensenella minuta* (DSMZ : DSM22607, *C. minuta* 1 et *C. minuta* 2) sur la prolifération des cellules HT-29 (adénocarcinome du colon). RLU : Relative Luminescence Unit (Unité de Luminescence Relative). Test de Dunnett où le groupe contrôle est le groupe GAM (qui représente le milieu de culture Gifu Anaerobic Broth). Code : *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

[0027] **DEFINITIONS**

[0028] Par « *bactéries* » au sens de l'invention, on entend également le terme « *souches bactériennes* ». Une souche bactérienne étant à comprendre comme étant une bactérie d'une souche donnée appartenant à une espèce particulière, par exemple l'espèce *Christensenella minuta*. On peut citer par exemple la souche bactérienne ou bactérie *Christensenella minuta*

DSM22607. Ainsi, les deux termes peuvent être indifféremment employés pour désigner une (des) bactérie(s) dans le contexte de l'invention.

[0029] Par « *hyperproduction d'interleukine 6* » au sens de l'invention, on entend une production excessive d'interleukine 6 par rapport à la production chez une personne ou un animal sain sans inflammation.

[0030] Par « *hyperproduction d'interleukine 8* » au sens de l'invention, on entend une production excessive d'interleukine 8 par rapport à la production chez une personne ou un animal sain sans inflammation.

[0031] Par « *sous-production d'interleukine 10* » au sens de l'invention, on entend une production insuffisante d'interleukine 10 par rapport à la production chez une personne ou un animal sain sans inflammation.

[0032] Par « *maladie chronique inflammatoire* » au sens de l'invention, on entend en particulier toute maladie chronique dont la physiopathologie, à évolution lente et progressive, est en lien direct avec une inflammation d'origine auto-immune et/ou auto-inflammatoire.

[0033] Par « *maladie gastro-intestinale inflammatoire* » au sens de l'invention, on entend en particulier, une affection intestinale inflammatoire, plus particulièrement une affection intestinale inflammatoire colique. Ladite affection intestinale inflammatoire colique peut, en particulier, être choisie dans le groupe constitué de la maladie de Crohn (MC), la recto-colite hémorragique (RCH) et la pochite, en particulier la MC et la RCH. La MC et la RCH sont deux maladies qui se caractérisent par l'inflammation de la paroi d'une partie du tube digestif, liée à une hyperactivité du système immunitaire digestif.

[0034] Par « *prévenir* » ou « *prévention* » au sens de l'invention, on entend la réduction à un degré moindre du risque ou de la probabilité d'occurrence d'un phénomène donné, c'est-à-dire, dans le contexte de la présente invention, une inflammation chronique, une inflammation gastro-intestinale et les pathologies en découlant tel un cancer, en particulier une inflammation intestinale.

[0035] Par « *traiter* » ou « *traitement* » au sens de l'invention, on entend une diminution de la progression de la maladie, une stabilisation, une inversion ou régression, voire une interruption ou inhibition de la progression d'une maladie inflammatoire chronique, d'une maladie gastro-intestinale inflammatoire, d'un cancer. Dans le contexte de l'invention, ces

termes s'appliquent également sur un ou plusieurs symptômes desdites maladies de la présente invention.

[0036] Par « *non-déficient en Christensenella* » dans le microbiote intestinal, au sens de la présente invention, on entend un être humain ou un animal dont les bactéries du genre *Christensenella* dans son microbiote intestinal représente au moins 0,01% en nombre du total des genres bactériens décelés dans son microbiote intestinal, en particulier au moins 0,1%, et préférentiellement au moins 0,5%. Recueilli dans les selles, l'abondance en *Christensenella* peut par exemple être mesurée par un test de séquençage quantitatif, de l'hybridation fluorescente in situ (FISH), de la qPCR (PCR quantitative) ou par des analyses du métagénome (quantification relative), bien connus de l'homme du métier.

[0037] Par « *milieu physiologiquement acceptable* » au sens de l'invention on entend un milieu qui est compatible avec l'organisme de l'individu auquel ladite composition doit être administrée. Il peut s'agir, par exemple, d'un solvant non toxique tel que l'eau. En particulier, ledit milieu est compatible avec une administration orale.

[0038] Par « *microbiote* », on entend l'ensemble des micro-organismes ayant colonisé un individu et avec lesquels il cohabite : des bactéries pour l'essentiel, mais également des virus, des champignons, des levures et des protozoaires. La composition du microbiote diffère selon les surfaces colonisées : on distingue ainsi le microbiote cutané, le microbiote vaginal, le microbiote urinaire, le microbiote respiratoire, le microbiote ORL (otorhinolaryngologie) et le microbiote intestinal, autrefois appelé flore intestinale, de loin le plus important avec ses 100 000 milliards de germes. Ainsi, on entend par « microbiote intestinal » l'ensemble des micro-organismes, notamment des bactéries, qui peuplent l'intestin d'un individu donné.

[0039] Par « *Indice de masse corporel* » (IMC), on désigne, selon une définition officielle de l'Organisme Mondiale de la Santé (OMS), l'indicateur des risques pour la santé associée à un poids excessif et à un poids insuffisant. L'IMC se calcule en divisant le poids de l'individu (en kilogrammes) par sa taille (en mètres) élevée au carré. Une valeur d'IMC est associée à une corpulence spécifique selon la classification donnée par l'OMS (https://www.who.int/features/factfiles/obesity/facts/fr/).

[0040] Par « quantité effective », « quantité effective à », « quantité de X efficace pour » et autres, se réfèrent à une quantité d'un ingrédient actif qui est efficace pour soulager ou réduire dans une certaine mesure un ou plusieurs des symptômes de la maladie dans la nécessité d'un traitement, ou pour retarder l'apparition de marqueurs cliniques ou de

symptômes d'une maladie qui ont besoin de prévention, lorsque le composé est administré. Ainsi, la quantité se réfère à une quantité de l'ingrédient actif qui présente des effets tels que (i) inverser le rythme de progression d'une maladie, (ii) inhiber dans une certaine mesure l'évolution de la maladie, et/ou, (iii) soulager dans une certaine mesure (ou, de préférence, en éliminant) un ou plusieurs symptômes associés à la maladie. L'efficacité de la quantité peut être déterminée empiriquement en expérimentant les composés concernés dans des systèmes modèles in vivo et *in vitro* connus pour une maladie nécessitant traitement.

[0041] **DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION**

[0042] L'invention a donc pour objet l'utilisation dans la prévention et/ou le traitement de maladies inflammatoires chroniques et/ou de maladies gastro-intestinales inflammatoires et/ou de cancers, en particulier de cancers à caractère inflammatoire, chez l'être humain ou l'animal, d'au moins une bactérie de la famille des *Christensenellacées,* préférentiellement du genre *Christensenella* ou d'une composition comprenant au moins un telle bactérie et/ou un surnageant de culture d'au moins ladite bactérie du genre *Christensenella.* La bactérie peut être toute souche bactérienne d'une des espèces du genre *Christensenella.* Préférentiellement, ladite composition comprenant en outre une bactérie additionnelle de la famille *Verrucomicrobiaceae* et/ou un surnageant de culture de ladite bactérie additionnelle, en particulier ladite bactérie est du genre *Akkermansia*, plus particulièrement de l'espèce *Akkermansia muciniphila.*

[0043] **Bactéries selon l'invention.**

[0044] L'invention vise donc une bactérie de la famille des *Christensenellacées*, en particulier du genre *Christensenella* pour son utilisation dans la prévention et/ou le traitement de maladies inflammatoires, préférentiellement de maladies inflammatoires chroniques et/ou de maladies gastro-intestinales inflammatoires et/ou de cancers chez l'être humain ou l'animal, en particulier chez des personnes ou des animaux présentant une maladie inflammatoire ou un cancer avec une hyperproduction d'interleukine 6 et/ou une hyperproduction d'interleukine 8 et/ou une sous-production d'interleukine 10.

[0045] Selon l'invention, les bactéries du genre *Christensenella*, lorsqu'elles sont administrées à un être humain ou un animal présentant une inflammation chronique, une inflammation gastro-intestinale ou un cancer, sont capables d'agir sur les molécules produites en excès lors d'une inflammation chronique, d' une inflammation gastro-intestinale ou d'un cancer, en particulier sur l'interleukine 6, l'interleukine 8 et la kynurenine, mais également sur le

TNFalpha, l'interleukine 1b, les lipocalines ou la calprotectine fécale. Ainsi, les inventeurs ont découvert que les bactéries du genre *Christensenella* possèdent la capacité inattendue de réduire *in vitro* et *in vivo* l'inflammation et la prolifération cellulaire, en particulier l'inflammation gastro-intestinale et plus particulièrement l'inflammation chronique de l'intestin. Plus particulièrement les bactéries selon la présente invention sont capables de réduire significativement la production de molécules pro-inflammatoires, telles que l'interleukine 6 (IL-6) et l'interleukine 8 (IL-8).

[0046] En effet, dans les maladies inflammatoires et cancers qui présentent une augmentation de l'un de ces marqueurs tels que l'interleukine 6, l'interleukine 8, la kynurénine, le TNFalpha, l'interleukine 1b, la lipocaline ou la calprotectine, leur diminution est le signe de la réduction de la voie de signal pro-inflammatoire, c'est-à-dire que les cellules immunitaires à l'origine de cette production sont moins stimulées. Dès lors, la réaction immunitaire excessive en cause de l'inflammation est ralentie et le système retourne progressivement à la norme.

[0047] Selon un mode de réalisation, la ou les bactéries utiles selon l'invention sont administrées à des êtres humains ou des animaux dans une quantité efficace pour une action sur au moins un de ces marqueurs de l'inflammation, c'est-à-dire pour diminuer la production d'au moins une de ces molécules dans l'organisme. Selon un mode de réalisation adapté, la ou les bactéries peuvent être administrées à raison d'une dose de 10^7 à 10^{11} unités formant des colonies (CFU) par jour, quel que soit le poids de la personne ou de l'animal, préférentiellement une dose de 10^9 à 10^{12} CFU par jour est administré, plus préférentiellement une dose égale à 10^9 CFU. En particulier, la dose comprend au moins une bactérie choisie parmi *Christensenella timonensis*, *Christensenella minuta, Christensenella massiliensis* et/ou leurs mélanges. Préférentiellement il s'agit d'une dose unique, c'est-à-dire administrée en une seule fois ou une dose avant chaque repas soit trois fois par jour.

[0048] Préférentiellement, la bactérie de la famille des *Christensenellacées,* en particulier du genre *Christensenella* est utile dans le traitement d'au moins une maladie inflammatoire chronique choisie parmi les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, les maladies inflammatoires chroniques du foie, les maladies inflammatoires chroniques du pancréas, les polyarthrites, les dermatites atopiques, les maladies neuro-inflammatoires, de la bronchopneumopathie chronique obstructive. En particulier, elle présente un effet dans la prévention et/ou le traitement d'au moins une maladie choisie parmi la maladie de Crohn, la

recto-colite hémorragique, la pochite, la colite ulcéreuse, la maladie cœliaque, la gastrite auto-immune, les hépatites, la stéatohépatite non alcoolique, la cholangite sclérosante primitive, la pancréatite, la polyarthrite rhumatoïde, la polyarthrite psoriatique, le psoriasis, l'eczema.

[0049] En outre, la bactérie de la famille des *Christensenellacées*, en particulier du genre *Christensenella* est utile dans le traitement d'au moins une maladie gastro-intestinale inflammatoire tel qu'une affection intestinale inflammatoire, plus particulièrement une affection intestinale inflammatoire colique. Par « affection » on entend au sens de l'invention une maladie, une pathologie. Ladite affection intestinale inflammatoire colique peut, en particulier, être choisie dans le groupe constitué de la maladie de Crohn, de la recto-colite hémorragique et de la pochite, en particulier dans le groupe constitué de la maladie de Crohn et de la recto-colite hémorragique.

[0050] En outre, la bactérie de la famille des *Christensenellacées,* en particulier du genre *Christensenella* est utile dans le traitement d'une maladie proliférative choisie parmi les lymphomes, les glioblastomes, les myélomes, les leucémies, les cancers colorectaux, les cancers du sein, de la prostate, de l'ovaire, de l'utérus, du pancréas, des poumons, du foie, de la vésicule biliaire et des reins.

[0051] La ou les bactéries utiles selon l'invention sont des bactéries du genre *Christensenella*. Il peut s'agir en particulier de *Christensenella massiliensis, Christensenella timonensis, Christensenella intestinihominis,* et/ou *Christensenella minuta.* Selon une variante particulièrement adaptée, il s'agit de *Christensenella minuta.*

[0052] Ces bactéries peuvent être isolées à partir de selles humaines par exemple selon les protocoles publiés par Morotomi et al. 2012 (*Morotomi, M., Nagai, F. & Watanabe, Y. Description of Christensenella minuta gen. nov., sp. nov., isolated from human faeces, which forms a distinct branch in the order Clostridiales, and proposal of Christensenellaceae fam. nov. INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY 62, 144–149 (2012)*) et NDongo et al. 2016 (*Ndongo, S., Dubourg, G., Khelaifia, S., Fournier, P. E. & Raoult, D. Christensenella timonensis, a new bacterial species isolated from the human gut. New Microbes and New Infections 13, 32–33 (2016)*). Ces documents décrivent également les méthodes de culture des bactéries utiles selon l'invention.

[0053] Eventuellement, lesdites bactéries sont disponibles et accessibles dans la collection des microorganismes et cultures cellulaires allemande GmbH, en particulier sous les numéros de dépôt DSM 22607, DSM 102344, DSM 102800.

[0054] **Composition selon l'invention.**

[0055] La ou les bactéries utiles selon l'invention, pour leur utilisation précédemment décrite, sont préférentiellement administrées dans une composition. Ladite composition comprenant, dans un milieu physiologiquement acceptable, au moins la ou les bactérie(s) utile(s) et/ou leur surnageant.

[0056] Ainsi, l'invention a également pour objet une composition comprenant au moins une bactérie du genre *Christensenella* dans la prévention et/ou le traitement de maladies inflammatoires chroniques et/ou de maladies gastro-intestinales inflammatoires et/ou de cancers, chez l'être humain ou l'animal, préférentiellement chez des personnes ou des animaux présentant une hyperproduction d'interleukine 6.

[0057] En particulier, l'invention permet de fournir une quantité efficace de bactéries de la famille des Christensenellacées, telles que Christensenella massiliensis, Christensenella timonensis, Christensenella intestinihominis et/ou Christensenella minuta, pour une utilisation dans le traitement :

- des maladies associées à une augmentation de l'interleukine 6 telles qu'un trouble inflammatoire, un trouble allergique, un trouble auto-immun, un trouble de rejet de greffe, l'athérosclérose, l'ostéoporose, une douleur neuropathique, une septicémie, la maladie de Castleman, un état fibrotique, l'arthrite rhumatoïde, l'arthrite rhumatoïde juvénile, l'arthrite psoriasique, l'arthrose, l'arthrite rhumatoïde réfractaire, l'arthrite non rhumatoïde chronique ou la spondylarthrite ankylosante,

- des maladies associées à une augmentation de l'interleukine 8 telles que la dermatite atopique, l'arthrose, la polyarthrite rhumatoïde, les maladies inflammatoires de l'intestin, la maladie de Crohn, la colite ulcéreuse, l'accident vasculaire cérébral, le choc septique, le choc endotoxique, le psoriasis, la septicémie à Gram négatif, le syndrome de choc toxique, les lésions de reperfusion rénale, la glomérulonéphrite, la thrombose, la réaction du greffon contre l'hôte, rejets d'allogreffes, paludisme, resténose, angiogenèse, athérosclérose, ostéoporose, gingivite et libération indésirable de cellules souches hématopoïétiques, maladies causées par des virus respiratoires, le virus de l'herpès et des virus de l'hépatite,

méningite, encéphalite herpétique, vascularite du SNC, lésions cérébrales traumatiques, tumeurs du SNC, hémorragie sous-arachnoïdienne, traumatisme post-chirurgical, mucoviscidose, prurit, pneumonie interstitielle, hypersensibilité, arthrite cristalline, arthrite de Lyme, fibrodysplasie ossifiante progressive, pancréatite aiguë et chronique, entérocolite nécrosante, sinusite chronique, uvéite, polymyosite, vascularite, acné, ulcères gastriques et duodénaux, maladie cœliaque, lupus, et/ou

- des maladies associées à une baisse de l'interleukine 10 ou pouvant être traitées en augmentant l'interleukine 10 telles que les maladies auto-immunes, le rejet de greffes d'organes et de moelle osseuse, la maladie du greffon contre l'hôte, les infections parasitaires, les granulomes, la maladie de Crohn, la colite, la pancréatite, les maladies inflammatoires des poumons, les maladies inflammatoires des yeux, la dermatite atopique et la rhinite.

[0058] Selon un mode de réalisation, l'invention concerne une composition pour son utilisation dans le traitement et/ou la prévention de maladies inflammatoires chroniques et/ou de maladie gastro-intestinales inflammatoires et/ou de cancers chez un être humain ou un animal, ladite composition comprenant, dans un milieu physiologiquement acceptable (i) au moins bactérie du genre *Christensenella*, et/ou (ii) un surnageant de culture d'au moins une bactérie du genre *Christensenella*.

[0059] La présente invention concerne également une composition pour son utilisation dans le traitement et/ou la prévention d'une maladie gastro-intestinale inflammatoire chez un individu, ladite composition comprenant, dans un milieu physiologiquement acceptable
(i) au moins une souche bactérienne choisie dans le groupe constitué de *Christensenella timonensis*, *Christensenella minuta* et/ou leurs mélanges,
et/ou
(ii) un surnageant de culture d'au moins l'une quelconque de ces souches bactériennes et/ou leurs mélanges.

[0060] Selon l'un des quelconques modes de réalisation précédents, la présente composition peut être administrée à un être humain souffrant de maladies inflammatoires chroniques et/ou de maladies gastro-intestinales inflammatoires et/ou de cancers, ledit être humain possédant un indice de masse corporel (IMC) inférieur à 25, en particulier ladite composition est administrée à un être humain souffrant de maladies gastro-intestinales inflammatoires.

[0061] Par « *IMC inférieur à 25* », on désigne un IMC strictement inférieur à 25, plus particulièrement un IMC inférieur ou égale à 24,9. Selon l'un quelconque de ces modes de réalisation, ledit être humain peut en particulier posséder un IMC inférieur à 25 et supérieur ou égal à 18,5.

[0062] Préférentiellement, ladite composition selon l'invention est caractérisée en ce que la bactérie du genre *Christensenella* est choisie parmi *Christensenella massiliensis, Christensenella timonensis* et/ou *Christensenella minuta et/ou Christensenella intestinihominis et/ou leurs mélanges.* Il peut s'agir en particulier d'un mélange de *Christensenella massiliensis* et *Christensenella timonensis* ou *Christensenella massiliensis* et *Christensenella minuta ou Christensenella massiliensis et Christensenella intestinihominis* ou *Christensenella timonensis* et *Christensenella minuta* ou *Christensenella timonensis et Christensenella intestinihominis ou Christensenella minuta et Christensenella intestinihominis ou Christensenella massiliensis, Christensenella timonensis* et *Christensenella minuta ou Christensenella massiliensis, Christensenella timonensis et Christensenella intestinihominis ou Christensenella timonensis* et *Christensenella minuta et Christensenella intestinihominis ou Christensenella massiliensis, Christensenella minuta et Christensenella intestinihominis ou Christensenella massiliensis, Christensenella timonensis* et *Christensenella minuta et Christensenella intestinihominis.*

[0063] Selon l'un quelconques des modes de réalisation précédents, la composition peut être utilisée chez un individu non déficient en *Christensenella* dans le microbiote intestinal, en particulier chez un être humain ou un animal dont le genre Christensenella représente au moins 0,01 % en nombre du total des genres bactériens de son microbiote intestinal.

[0064] La ou les bactéries sont présentes dans une quantité efficace dans la composition permettant un effet sur les maladies chroniques inflammatoires et/ou les maladies gastro-intestinales inflammatoires et/ou les cancers dont sont atteints les personnes ou les animaux traités. Par « personne », on entend un individu en particulier un être humain ou un animal.

[0065] Préférentiellement, la composition utile selon l'un des quelconques modes de réalisation précédent comprend 10^6 à 10^{12} unités formant des colonies (CFU) de bactéries du genre *Christensenella* par dose quotidienne à administrer de ladite composition. Préférentiellement cela correspond à une dose quotidienne de bactéries à administrer, quel que soit le poids de la personne ou de l'animal. De façon préférée, cette dose est administrée en une seule fois. En particulier la composition utile comprend 10^7 à 10^{11} CFU de bactéries du

genre *Christensenella* par dose quotidienne à administrer, de préférence 10^9 CFU. En particulier lesdites bactéries présentes dans la composition peuvent être d'une même espèce, d'un mélange d'espèces ou d'un mélange de souches bactériennes. La composition utile selon l'invention peut être sous forme liquide. Elle peut notamment comprendre des bactéries de la famille des *Christensenellacées*, en particulier du genre *Christensenella* et/ou un milieu de culture desdites bactéries qui permet de les conserver, comme par exemple préférentiellement le milieu Columbia agar anaérobique enrichi en sang de mouton, ou un milieu équivalent ne contenant pas de produit dérivé d'origine animale. Par « milieu de culture » on entend au sens de la présente invention, le surnageant de culture dans lequel les bactéries ou les souches bactériennes ont séjourné lors de leur culture, ou milieu extracellulaire.

[0066] Selon une variante, la composition utile selon l'invention peut se présenter sous forme solide. Dans ce cas les bactéries peuvent être présentes sous forme lyophilisée, et peuvent comprendre également des excipients tels que par exemple la cellulose microcrystalline, le lactose, le saccharose, le fructose, le lévulose, les amidons, le stachyose, le raffinose, l'amylum, le lactate de calcium, le sulfate de magnésium, le citrate de sodium, le calcium stearate, la polyvinylpyrrolidone, la maltodextrine, les galactooligosaccharides, les fructooligosaccharides, les pectines, les béta-glucans, les lactoglobulines, les isomaltooligosaccharides, les polydextroses, le sorbitol et/ou le glycérol.

[0067] Les compositions utiles selon l'invention peuvent se présenter sous forme de poudre, de poudre microencapsulée, de gélule, de capsule, de comprimé, de pastille, de granulés, d'émulsion, de suspension, de suppositoire, d'un produit alimentaire, d'une boisson, d'un produit pharmaceutique, d'un nutraceutique, d'un additif alimentaire, d'un complément alimentaire ou d'un produit laitier.

[0068] Selon un mode de réalisation particulièrement adapté, elles peuvent se présenter sous une forme gastro-résistante, telles qu'un comprimé enrobé contenant des bactéries microencapsulées. Ladite composition peut ainsi être pourvue d'un enrobage résistant au suc gastrique, afin d'assurer que la bactérie de l'invention comprise dans ladite composition puisse traverser l'estomac endommagé. La libération de(s) la bactérie(s) peut ainsi se produire pour la première fois dans le tractus intestinal supérieur.

[0069] Plus particulièrement, la composition selon l'invention peut être comprise dans un complément alimentaire. Un complément alimentaire pour une administration par la voie

orale peut être présent dans des capsules, des gélules, des capsules molles, des comprimés, des comprimés dragéifiés, des pilules, des pâtes, des pastilles, des gommes, des solutions ou émulsions buvables, un sirop ou un gel.

[0070] Un complément alimentaire selon la présente invention peut comprendre en outre un édulcorant, un stabilisant, un antioxydant, un additif, un agent aromatisant et/ou un colorant. La formulation de celui-ci est effectuée au moyen des procédés usuels pour produire des comprimés dragéifiés, des gélules, des gels, des hydrogels pour libération contrôlée, des émulsions, des comprimés ou des capsules.

[0071] Une composition selon la présente invention peut également être sous la forme d'une composition nutritionnelle. Une telle composition nutritionnelle selon la présente invention est sous la forme d'un yogourt, une barre de céréale, des céréales pour le petit-déjeuner, un dessert, un aliment congelé, une soupe, un aliment pour animaux de compagnie, une suspension liquide, une poudre, un comprimé, une gomme ou un bonbon.

[0072] Une composition selon la présente invention peut comprendre en outre au moins un ingrédient choisi parmi : des antioxydants, des huiles de poisson, DHA, EPA, des vitamines, des minéraux, des phytonutriments, une protéine, un lipide, des probiotiques et des combinaisons de ceux-ci. Les bactéries selon l'invention seules ou comprises dans la composition selon l'un quelconque des modes de réalisation précédents peuvent être utilisées vivantes, semi-actives, inactivées, ou mortes, préférentiellement sous une forme vivante. Les bactéries sous forme semi-actives, inactivées, ou mortes peuvent l'être par exemple par irradiation, inactivation thermique ou lyophilisation, en particulier par la chaleur, l'exposition à un pH approprié, aux UV, aux rayons gamma, aux rayons X ou à la mise sous haute pression. Le terme "*semi-active*" désigne ainsi une bactérie à faible activité physiologique dont la capacité à proliférer est réduite, temporairement ou définitivement. Le terme « *inactivé* » désigne une bactérie qui n'est plus capable, temporairement ou définitivement, de proliférer. Le terme « *morte* » désigne une bactérie qui n'est plus capable, définitivement, de proliférer. Les bactéries mortes ou inactivées peuvent avoir les membranes cellulaires intactes ou rompues. Ainsi le terme « *inactivé* » désigne également les extraits et lysats de bactéries obtenues.

[0073] Une bactérie selon l'invention seules ou dans la composition selon l'invention peut être mise en œuvre sous forme entière, c'est-à-dire pour l'essentiel dans sa forme native, ou sous forme d'extraits ou de lysats comprenant des fractions et/ou des métabolites de ce

microorganisme. Un tel lysat peut désigner l'intégralité du lysat obtenu par lyse ou seulement une fraction de celle-ci et peut être préparé selon une des méthodes classiques bien connues de l'homme du métier telles que par exemple un choc thermique, par ultrasons, un choc osmotique, ou sous contrainte mécanique, telle que par centrifugation. Elles peuvent être toutes vivantes, toutes semi-actives, toutes inactivées ou toutes mortes. En particulier, il peut s'agir d'un mélange de bactéries vivantes, semi-actives, inactivées et mortes.

[0074] Préférentiellement, au moins une partie des bactéries sont vivantes, en particulier au moins 50% (en nombre), encore plus préférentiellement au moins 90% (en nombre).

[0075] Ainsi, selon un mode de réalisation adapté, les bactéries présentes dans la composition utile selon l'invention sont pour au moins 50% des bactéries vivantes (en nombre), préférentiellement pour au moins 90% des bactéries vivantes (en nombre), encore plus préférentiellement toutes vivantes.

[0076] Les conditions de conservation selon l'invention se présentent pour des formulations liquides sous la forme d'un produit congelé maintenu à -20°C dans un sachet hermétique. Pour les formulations solides, les conditions de conservation selon l'invention comprennent une capsule ou un enrobage hermétique à la lumière et à l'oxygène maintenu à une température ambiante comprise entre 15°C et 40°C et un taux d'humidité compris entre 3% et 70%.

[0077] Une composition selon l'un quelconque des modes de réalisation précédents est prévue pour le tube digestif, en particulier l'intestin. Par conséquent, les bactéries utiles selon l'invention, et en particulier les compositions l'incluant, peuvent être administrées par voie orale, topique, inhalée ou rectale, préférentiellement rectale ou intrarectale.

[0078] En particulier, une administration rectale ou intrarectale est conduite sous la forme d'un suppositoire, un lavement ou une mousse.

[0079] Les inventeurs ont également déterminé, de manière surprenante, la capacité de souches de *Christensenella* à augmenter les propriétés anti-inflammatoires d'une souche d'*Akkermansia*, et en particulier de la souche *Akkermansia muciniphila*. Ainsi, les inventeurs ont mis en évidence l'existence d'un effet synergique d'une association d'une souche de *Christensenella* (ou d'un surnageant de culture d'une telle souche) et d'une souche d'*Akkermansia* (ou d'un surnageant de culture d'une telle souche) sur la prévention et/ou le traitement d'une inflammation gastro-intestinale, et en particulier l'effet synergique d'une association d'une souche de *Christensenella minuta* et/ou de *Christensenella timonensis* (ou

de surnageants de culture de telles souches) et d'une souche d'*Akkermansia muciniphila* (ou d'un surnageant de cette souche) sur la prévention et/ou le traitement d'une inflammation gastro-intestinale.

[0080] Ainsi, selon l'un quelconque des modes de réalisation précédent, la composition peut comprendre en outre :

(i) au moins une bactérie additionnelle de la famille *Verrucomicrobiaceae ;* et/ou

(ii) un surnageant de culture de ladite bactérie additionnelle.

[0081] Préférentiellement, la bactérie additionnelle de la famille *Verrucomicrobiaceae* est une bactérie du genre *Akkermansia*, plus particulièrement de l'espèce *Akkermansia muciniphila*. Par bactérie de l'espèce « *Akkermansia muciniphila* » on entend au sens de l'invention également la bactérie dénommé « Akkermansia *municiphila* ».

[0082] Selon un mode de réalisation, la bactérie et la bactérie additionnelle telles que mentionnées ci-dessus sont, indépendamment l'une de l'autre, sous une forme vivante, semi-active, inactivée et/ou morte, et sont en particulier sous une forme vivante.

[0083] Dans certains modes de réalisation, une composition selon l'invention est adaptée pour l'administration d'une dose journalière représentant de 10^7 à $l0^{11}$ unités formant des colonies (UFC), de préférence une dose journalière équivalente à 10^9 UFC, d'une bactérie de la famille *Verrucomicrobiaceae*, en particulier du genre *Akkermansia*, plus particulièrement d'une bactérie *Akkermansia muciniphila*.

[0084] Dans le cas de la mise en œuvre d'un surnageant de culture de l'une quelconque des bactéries susmentionnées, une composition selon l'invention peut notamment en comprendre une teneur comprise entre 0,1 et 99 % en poids, notamment de 10 à 90 % en poids, en particulier de 25 à 70 % en poids et plus particulièrement de 30 à 50 % en poids, par rapport au poids total de la composition.

[0085] Ainsi, une composition selon l'un quelconque des modes de réalisation susmentionnés peut comprendre une teneur comprise entre 0,1 et 99 % en poids, notamment de 10 à 90 %, en particulier de 25 à 70 % en poids, plus particulièrement de 30 à 50 % en poids, de surnageant par rapport au poids total de la composition.

[0086] Les compositions utiles selon l'invention, en plus des bactéries utiles selon l'invention peuvent comprendre au moins un probiotique, et/ou au moins un prébiotique.

[0087] Les compositions utiles selon l'invention, en plus des bactéries utiles selon l'invention peuvent comprendre d'autres composés, tels que :

- au moins un probiotique, et/ou
- au moins une bactérie produisant de l'acide lactique qui permet de créer un environnement anaérobique favorable aux *Christensenellacées* telle qu'au moins une bactérie choisie parmi les bactéries du genre *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium* spp., *Streptococcus* spp. et/ou au moins un autre organisme favorisant les conditions anaérobiques nécessaires à la survie des *Christensenellacées* telle qu'au moins une levure choisie parmi des *Saccharomyces* spp. ou des micro-organismes de la famille des *Methanobacteriaceae* et/ou
- au moins une bactérie associée à l'écosystème des *Christensenellacées* car elles facilitent leur survie dans l'intestin telle qu'au moins une bactérie choisie parmi les bactéries du phylum Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Tenericutes, et Verrucomicrobia, et/ou
- au moins une bactérie choisie parmi les bactéries de l'ordre des *Clostridales*, des *Verrucomicrobiales, des Aeromonadales*, des *Alteromonadales, ML615J-28, RF32, YS2,* de la famille des *Clostridiacées*, des *Lachnospiracées*, des *Ruminococcacées*, des *Bacteroidacées*, des *Enterococcacées*, des *Rikenéllacées*, des *Dehalobactériacées*, *des Veillonellacées* et/ou
- au moins une bactérie choisie parmi les bactéries du genre *Faecalibacterium*, *Akkermansia*, *Eubacterium* et *Oscillospira* telle que par exemple *Faecalibacterium prausnitzii*, *Akkermansia muciniphila*, *Eubacterium halii*, *Oscillospira guilliermondii*., et/ou
- au moins un prébiotique tel que par exemple au moins un prébiotique choisi parmi les galactooligosaccharides, les fructooligosaccharides, les inulines, les arabinoxylans, les béta-glucanes, les lactoglobulines et/ou les béta-caséines, et/ou
- au moins un polyphénol tel que par exemple au moins un polyphénol choisi parmi la quercetin, le kaempferol, le resvératrol, les flavones (comme la lutéoline), les flavan-3-ols (comme les catéchines), les flavanones (comme la narinénine), les isoflavones, les anthocyanidines, les proanthocyanidines, et/ou
- au moins un minéral et/ou au moins une vitamine et/ou au moins un agent nutritionnel, et/ou
- au moins un principe actif pharmaceutique préférentiellement choisi parmi les anti-inflammatoires non stéroïdien, les anticorps dirigés contre des cibles pro-inflammatoires (anti-TNFalpha), les antirhumatismaux, les analgésiques, les antimicrobiens, les corticostéroïdes, les anaboliques stéroïdiens, les antidiabétiques, les agents thyroïdiens, les antidiarrhéiques, les antitussifs, les antiémétiques, les anti ulcères, les laxatifs, les anticoagulants, l'érythropoïétine, les immunoglobulines, les immunosuppresseurs, les

hormones de croissance, les médicaments hormonaux, les modulateurs des récepteurs aux œstrogènes, les agents alkylant, les antimétabolites, les inhibiteurs mitotiques, les radiopharmaceutiques, les anti-dépresseurs, les antipsychotiques, les anxiolytiques, les hypnotiques, les sympathomimétiques, les stimulants, le donepezil, la tacrine, les médicaments pour l'asthme, les bêta-agonistes, les stéroïdes inhalés, les inhibiteurs de leucotriène, les cromoglycates ou acides cromoglycidiques, l'épinéphrine, la dornase alpha, les cytokines, les antagonistes de cytokines.

[0088] Selon un dernier objet, la présente invention concerne une composition comprenant, dans un milieu physiologiquement acceptable :

(I) (a) au moins une bactérie choisie dans le groupe constitué de *Christensenella timonensis*, *Christensenella minuta, Christensenella massiliensis*, *Christensenella intestinihominis,* et/ou leurs mélanges ;

et/ou

(b) au moins un surnageant de culture d'au moins une bactérie choisie dans le groupe constitué de *Christensenella timonensis*, *Christensenella minuta, Christensenella massiliensis, Christensenella intestinihominis,* et/ou leurs mélanges;

et

(II) (a) au moins une bactérie additionnelle du genre *Akkermansia*, plus particulièrement de l'espèce *Akkermansia muciniphila* ;

et/ou

(b) au moins un surnageant de culture d'au moins une bactérie additionnelle du genre *Akkermansia*, plus particulièrement de l'espèce *Akkermansia muciniphila*.

[0089] **Méthode de prévention et/ou traitement.**

[0090] Selon un autre aspect, la présente invention se rapporte à une méthode pour réduire et/ou prévenir l'inflammation chez un individu en ayant besoin, comprenant l'administration d'une quantité effective d'une bactérie de la famille *Christensenellacées* audit individu, en particulier une bactérie de l'espèce *Christensenella.*

[0091] L'invention concerne également une méthode pour réduire le niveau d'IL-6 et/ou stabiliser le niveau d'IL-6 et/ou prévenir une augmentation du niveau d'IL-6 chez un individu en ayant besoin, comprenant l'administration d'une quantité effective d'une bactérie de la famille *Christensenellacées* audit individu, en particulier une bactérie de l'espèce *Christensenella.* Préférentiellement, ledit individu présentant des taux sériques élevés d'IL-6

avant le traitement. En particulier, lesdits taux sériques élevés d'IL-6 sont supérieurs à 5 pg/ml, supérieur à 10 pg/ml, supérieur à 20 pg/ml, supérieur à 30 pg/ml, supérieur à 40 pg/ml, supérieur à 50 pg/ml, supérieur à 70 pg/ml, supérieur à 90 pg/ml ou supérieur à 100 pg/ml.

[0092] L'invention concerne également une méthode pour réduire le niveau d'IL-8 et/ou stabiliser le niveau d'IL-8 et/ou prévenir une augmentation du niveau d'IL-8 chez un individu en ayant besoin, comprenant l'administration d'une quantité effective d'une bactérie de la famille *Christensenellacées* audit individu, en particulier une bactérie de l'espèce *Christensenella.* Préférentiellement, ledit individu présentant des taux sériques élevés d'IL-8 avant le traitement. En particulier, lesdits taux sériques élevés d'IL-8 sont supérieurs à 5 pg/ml, supérieur à 10 pg/ml, supérieur à 20 pg/ml, supérieur à 30 pg/ml, supérieur à 40 pg/ml, supérieur à 50 pg/ml, supérieur à 70 pg/ml, supérieur à 90 pg/ml ou supérieur à 100 pg/ml.

[0093] L'invention concerne également une méthode pour augmenter le niveau d'IL-10 et/ou stabiliser le niveau d'IL-10 et/ou prévenir une diminution du niveau d'IL-10 chez un individu en ayant besoin, comprenant l'administration d'une quantité effective d'une bactérie de la famille *Christensenellacées* audit individu, en particulier une bactérie de l'espèce *Christensenella.* Préférentiellement, ledit individu présentant des taux sériques faibles d'IL-10 avant le traitement. En particulier, lesdits taux sériques faibles d'IL-10 sont inférieurs à 15 pg/ml, inférieur à 10 pg/ml ou inférieur à 5 pg/ml.

[0094] En outre, l'invention concerne une méthode pour réduire le niveau de kynurenine et/ou stabiliser le niveau de kynurenine et/ou prévenir une augmentation du niveau de kynurenine chez un individu en ayant besoin, comprenant l'administration d'une quantité effective d'une bactérie de la famille *Christensenellacées* audit individu, en particulier une bactérie de l'espèce *Christensenella.* Préférentiellement, ledit individu présentant des taux élevés de kynurénine fécale avant le traitement.

[0095] L'invention concerne également une méthode de traitement et/ou de prévention d'un cancer associé à une inflammation chez un individu en ayant besoin, comprenant l'administration d'une quantité effective de la bactérie Christensenellacées audit individu.

[0096] La méthode selon la présente invention permet de réduire le niveau d'au moins un des marqueurs de l'inflammation cité ci-avant chez ledit individu, ledit marqueur étant préférentiellement réduit dans le sérum, le sang ou les selles.

[0097] Préférentiellement, les présentes méthodes sont mises en œuvre chez un individu souffrant d'une ou plusieurs maladies précédemment décrites dans la description. Ledit individu étant préférentiellement un être humain.

[0098] Préférentiellement, la bactérie Christensenella comprend un gène d'ARN ribosomique 16S présentant une identité de séquence d'au moins 50%, d'au moins 60%, d'au moins 70%, d'au moins 80% ou, de préférence, d'au moins 90% avec un gène d'ARN ribosomique 16S de Christensenella minuta, Christensenella massiliensis, ou Christensenella timonensis, plus préférablement encore, au moins 97 % d'identité de séquence avec une séquence choisie parmi les SEQ ID NO : 1, 2, 3, 4, 5 ou 6.

[0099] La SEQ ID NO: 1 est une séquence du gène d'ARN ribosomal 16S de la bactérie Christensenella minuta DSM 22607, qui a été isolée à partir d'un échantillon fécal humain. La séquence d'ARNr 16S de C. minuta est identifiée par le numéro d'accès Genbank AB490809. La SEQ ID NO: 2 est une partie de la séquence du gène d'ARN ribosomal 16S de la bactérie Christensenella minuta DSM 22607. Des séquences 16S supplémentaires pour les bactéries du genre de Christensenella sont fournies telles que les SEQ ID NOS: 3-6 (numéros OTU 701845, 177179, 1146771, et 361793 dans la base de données Greengenes, respectivement). L'identité de chaque séquence par rapport à SEQ ID NO: 1 est la suivante: SEQ ID NO: 3, 93% d'identité avec SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 4, 95% d'identité avec SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 5, 97% d'identité avec SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 6, 95% d'identité avec SEQ ID NO: 1.

[0100] En particulier, lesdites méthodes comprennent l'administration d'au moins une bactérie ou composition selon la présente invention caractérisé par l'un des quelconques mode de réalisation décrits précédemment, tel que le mélange ou non des bactéries, la quantité administrée, la quantité de bactéries viables, les composants supplémentaires, par exemple des principes actifs pharmaceutiques, des prébiotiques ou probiotiques, des vitamines, minéraux, agents nutritionnels, autres micro-organismes, la formulation particulière de ladite composition, par exemple, poudre, gélule etc.

[0101] Bien entendu, les présentes méthodes comprennent l'administration orale, inhalée, topique, rectale ou intrarectale d'une quantité suffisante.

[0102] L'invention est à présent illustrée par des exemples de bactéries utiles selon l'invention, de procédés de cultures de ces bactéries, des exemples de compositions les

contenant et des résultats d'essais démontrant l'efficacité de l'invention qui sont présentés à titre d'illustration uniquement.

[0103] **EXEMPLES**

[0104] **Exemple 1 : *Christensenella minuta.***

Christensenella minuta peut-être cultivée selon le protocole opératoire décrit en suivant.

1/ Dissoudre un milieu RCM ("Reinforced Clostridial Medium" milieu clostridiale renforcé) déshydraté dans de l'eau distillée

2/Ajouter 0,5 mL/L de solution de résazurine-Na (0,1% p/v)

3/Porter à ébullition et refroidir à température ambiante tout en injectant un mélange gazeux à 80% de N_2 et à 20% de CO_2

4/Etaler le milieu sous la même atmosphère gazeuse dans des tubes de type Hungate anoxiques ou dans des flacons de sérum puis autoclaver

5/Avant utilisation, ajoutez 1,0 g de carbonate de sodium par litre à partir d'une solution mère anoxique stérile préparée avec un mélange gazeux à 80% de N_2 et à 20% de CO_2

6/ Vérifier le pH du milieu après autoclavage et ajuster le pH entre 7,3 et 7,5, en utilisant une solution mère anoxique stérile de bicarbonate de sodium (5% p / v) préparée dans une atmosphère gazeuse à 80% de N_2 et à 20% de CO_2.

[0105] **Exemple 2 : *Christensenella massiliensis.***

Christensenella massiliensis peut-être cultivée selon le protocole opératoire décrit en suivant.

[0106] 1/Préparer un milieu carboxyméthylcellulose (N_2 / CO_2) en suivant les instructions suivantes fournies par DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen).

[0107] [Tableau 1]

Casitone	30.0 g
Extrait de levure	5.0 g
K_2HPO_4	5.0 g
Na-resazurin solution (0.1% w/v)	0.5 ml
L-Cysteine-HCl x H_2O	0.5 g
D-Glucose	4.0 g
Cellobiose	1.0 g
Maltose	1.0 g

Viande hachée (sans gras)	500.0 g
NaOH 1 N	25.0 ml
Eau distillée	1000ml
Amidon (soluble)	1.0 g
Na_2CO_3	1.5 g
Filtrat de viande (voir Tableau 2)	1000ml

[0108] 2/Dissoudre les différents constituants listés dans le tableau ci-dessus, sauf la cystéine, les carbohydrates et le carbonate.

3/Faire bouillir le milieu pendant 1 min, puis le laisser refroidir à la température ambiante sous une atmosphère gazeuse à 80% de N_2 et à 20% de CO_2.

4/Ajouter 0,5 g/L de L-cystéine-HCl x H_2O et le verser sous la même atmosphère gazeuse dans des tubes de type Hungate (pour les souches exigeant des particules de viande, introduire celles-ci en premier dans le tube, utiliser 1 partie de particules de viande pour 4 ou 5 parties de liquide).

5/ Autoclavage à 121°C pendant 20 min.

6/ Après autoclavage, ajouter le glucose, le cellobiose, le maltose et l'amidon provenant de solutions mères anoxiques stériles préparées à 100% de gaz N_2 et de carbonate à partir d'une solution mère anoxique stérile préparée sous des mélanges gazeux à 80% de N_2 et 20% de CO_2.

7/ Ajuster le pH du milieu à 7, si nécessaire.

Préparation du Filtrat de viande :

[0109] [Tableau 2]

[0110] Utiliser du bœuf maigre ou de la viande de cheval.

Enlever la graisse et le tissu conjonctif avant de hacher.

Mélanger la viande, l'eau et NaOH, puis faire bouillir pendant 15 min sous agitation.

Laisser refroidir à la température ambiante, retirer la graisse de la surface et filtrer, en retenant les particules de viande et le filtrat.

Ajouter au filtrat de l'eau jusqu'à un volume final de 1000,0 ml.

Les bactéries doivent être cultivées en condition anaérobie à 37°C.

[0111] **Exemple 3 : *Christensenella timonensis***

Christensenella timonensis peut-être cultivée selon le même protocole opératoire que celui décrit à l'exemple 2 pour *Christensenella massiliensis*.

[0112] **Exemple 4 : Souches particulière selon l'invention**

Toutes les souches décrites ci-après ont été obtenues auprès de la collection allemande DSMZ (Institut Leibnitz DSMZ). *Christensenella minuta* DSM 22607, *Christensenella timonensis* DSM 102800 et *Akkermansia muciniphila* DSM 22959 ont été cultivées à 37°C dans un milieu YBHI [milieu de perfusion cerveau-coeur complété avec 0.5 % d'extrait de levure (Difco)] additionné de cellobiose (1 mg/ml ; Sigma), de maltose (1 mg/ml ; Sigma), de cystéine (0,5 mg/ml ; Sigma) et de mucine (1 mg/ml ; Sigma) dans une chambre anaérobie remplie avec N_2 = 85%, CO_2 =10% et H_2 = 5%.

[0113] **Exemple 5 : Composition utile sur la base de surnageants**

Un exemple de composition utile selon l'invention est une composition comprenant entre 0,1 et 95% de surnageant de culture des souches *Christensenella minuta* DSM 22607, *Christensenella timonensis* DSM 102800 et *Akkermansia muciniphila* DSM 22959.

[0114] **Exemple 6 : Composition utile selon l'invention sous forme liquide**

Un exemple de composition utile selon l'invention sous forme liquide est une composition comprenant *Christensenella minuta* 10^9 CFU/mL dans le milieu de culture RCM anaérobie décrit ci-dessus modifié pour ne contenir aucun produit d'origine animale et enrichi en glycérol 5%.

La composition de l'exemple 6 est obtenue à partir d'une RCB (« research cell bank » banque de cellules de recherche) préparée à base de *Christensenella minuta* 10^{10} CFU/mL puis conservée congelée à -20°C dans un sachet hermétique à l'oxygène.

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

[0115] **Exemple 7 : Composition utile selon l'invention sous forme solide**

[0116] Un exemple de composition utile selon l'invention sous forme lyophilisée peut être obtenu par lyophilisation de la composition de l'exemple 6 à l'état congelé.

[0117] **RESULTATS D'ESSAIS DEMONTRANT L'EFFET DE L'INVENTION**

[0118] **1. Démonstration de l'effet anti-inflammatoire de bactéries *christensenella in vitro* (kynurénine).**

[0119] L'objectif de cette étude est de démontrer l'effet anti-inflammatoire *in vitro* de bactéries christensenella selon l'invention. La démonstration de cet effet a été réalisée sur la kynurénine, un marqueur connu de l'inflammation. Des feces humaines ont été prélevées et cultivées dans un fermenteur. L'abondance de *Christensenella spp.* a été corrélée avec l'abondance de kynurénine présente dans le fermenteur.

[0120] Le protocole opératoire de l'étude est décrit en suivant.

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

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

- La collecte des échantillons frais de leur fèces est obtenue dans des contenants stériles en plastique, conservés dans des flacons anaérobies contenant un sachet de 2,5l d'AnaeroGen™ d'Oxoid™ (O_2 <0.1%; CO_2: 7-15%). Ces échantillons ont été apportés au laboratoire dans les deux heures après leur production.

- Les échantillons de féces ont été dilués au 1/5 (poids/volumes) dans une solution saline tamponnée au phosphate (1M) (PBS), pH 7,4. La suspension a été homogénéisée dans un stomacher pendant 120 secondes.

- Milieu nutritif de base: le milieu nutritif de base a été preparé à partir de 2g/L de bouillon de tryptone de soja, 2g/L d'extrait de levure, 0,1g/L de NaCl, 0,04g/L de K_2HPO_4, 0,01g/L de $MgSO_3.7H_2O$, 0,01g/L de $CaCl_2.6H_2O$, 2g/L $NaHCO_3$, 0,5g/L de L–cystine HCl, 2mL/L de tween 80, 10µL/L de vitamine K1, 0,05g/L d'hème, 0,05g/L de sels biliaires, 4ml/L de résazarin (pH7)

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

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

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

2/ Quantification de la kynurenine

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

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

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

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

3/ Quantification de *Christensenella* spp.

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

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

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

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

[0121] La quantité relative de kynurénine (par rapport à la quantité totale mesurée) et l'abondance relative de *Christensenella* spp. (par rapport à la quantité totale mesurée) ont été analysées et corrélées, obtenant une régression linéaire de R=-0,44 (n=18). Les résultats sont présentés dans le Tableau 3.

[0122] [Tableau 3]

Echantillons	Abondance relative de *Christensenella* spp. ($x10^{-2}$)	Quantité relative de Kynurénine ($x10^{-5}$)
V1	7,55	0
V2	3,18	0
V3	8,19	0
V4	2,63	3,46
V5	1,26	3,67
V6	2,87	0
V7	7,20	8,18
V8	2,91	4,58
V9	6,32	0
V10	1,21	13,00
V11	4,23	14,19
V12	1,49	8,36
V13	9,83	0
V14	4,12	2,87
V15	6,45	0
V16	2,02	5,30
V17	5,23	4,76
V18	7,57	2,92

[0123] **2. Démonstration de l'effet anti-inflammatoire de bactéries *christensenella in vitro* (IL-8)**

[0124] L'objectif de cette étude est de démontrer l'effet anti-inflammatoire *in vitro* de bactéries selon l'exemple 4. La démonstration a été réalisée sur un des marqueurs de l'inflammation : l'interleukine 8 (IL-8).

[0125] L'étude est réalisée sur des cellules HT-29 obtenues comme suit :

Des cellules épithéliales du colon humain HT-29 (ATCC HTB-38) (LGC-Standars) ont été cultivées dans un milieu minimum essentiel de Eagle modifié de Dulbecco (DMEM) (Sigma-Aldrich) complété avec 10% (p/v) de sérum fœtal bovin (FBS) thermo-activé (GibcoBRL, Eragny, France) et de pénicilline G/ streptomycine (5000 IU/mL, 5000 µg/ml) (Sigma-Aldrich).

Les cultures de cellules ont été incubées dans des flacons de culture tissulaire de 25 cm^2 (Nunc, Roskilde, Danemark) à 37 ºC dans une atmosphère de CO_2 à 5% (v/v) jusqu'à confluence.

[0126] Le protocole opératoire de l'étude est décrit en suivant.

[0127] Les cultures simples et les co-cultures composées des combinaisons entre les souches énumérées sont préparées au temps 0. A 24h, les échantillons bactériens sont centrifugés pendant 10 minutes à 6000 tr/min. Les surnageants ainsi obtenus sont conservés à -80°C afin de poursuivre l'analyse des propriétés immunomodulatrices *in vitro*.

[0128] Des tests anti-inflammatoires ont été effectués selon la procédure décrite par Kechaou *et al.*, 2012 (Kechaou N *et al.*:Appl Environ Microbiol 2012, 79:1491-1499). Spécifiquement, 50000 cellules HeLa ou HT-29 par puits ont été semées dans des plaques de culture de 24 puits (Nunc). Vingt-quatre heures avant la mise en contact bactérienne, le milieu de culture a été remplacé par un milieu contenant 5 % de FBS. Les expériences ont été entreprises le 7^e jour après l'ensemencement, alors que les cellules étaient à la confluence ($1,83x10^6$ cellules/puits). Vingt-quatre heures avant la co-culture bactérienne (jour 6), le milieu de culture a été remplacé par un milieu contenant 5% de FBS inactivé à la chaleur et 1% de glutamine. Le jour de la co-culture, 10 % de surnageant bactérien ont été ajoutés au DMEM dans un volume total de 500 µl. Les cellules ont été stimulées simultanément avec du TNF-α humain (5 ng/ml ; Peprotech, NJ) pendant 6 h à 37°C dans 10% de CO_2. Tous les échantillons ont été analysés en trois exemplaires. Après la co-incubation, les surnageants cellulaires ont été prélevés et stockés à -80 °C jusqu'à ce que l'ELISA (Biolegend, San Diego, CA) effectue une analyse plus poussée des concentrations d'interleukine-8 (IL-8). Les expériences ont été faites au moins en trois exemplaires.

[0129] La Figure 1 représente la production d'IL-8 dans des cellules HT-29 stimulées par du TNF -α en présence de *Christensenella minuta*, *Christensenella timonensis, Akkermansia muciniphila, Christensenella minuta* + *Akkermansia muciniphila* et *CChristensenella timonensis* + *Akkermansia muciniphila*. Les résultats sont exprimés en IL-8 (pg/mL) et ont été normalisés en utilisant comme valeur de référence l'IL-8 produit après la co-incubation avec le PBS comme témoin négatif. Les résultats ont été analysés à l'aide d'un test de Kruskal Wallis suivi d'un test de comparaison multiple de Dunns (*p< 0,05 ; **p<0,01).

[0130] Le logiciel GraphPad (GraphPad Sofware, La Jolla, CA, USA) a été utilisé pour l'analyse statistique. Les résultats sont présentés sous forme de boîte à moustaches (min à max). Des

comparaisons ont été réalisées avec le test non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi d'une comparaison multiple de Dunn. Une valeur p inférieure à 0,05 a été jugée significative.

[0131] Les résultats sont décrits ci-après :

[0132] La souche de référence *Akkermansia* muciniphila DSM 22959 est bien connue pour ses propriétés immunomodulatrices et plus particulièrement pour ses effets anti-inflammatoires (Derrien M, Belzer C, de Vos WM. Microb Pathog. 2017 May; 106:171-181. doi: 10.1016/j.micpath.2016.02.005. Epub 2016 Feb 11). Pour déterminer si les souches de C *Christensenella* minuta DSM 22607 et *Christensenella timonensis* DSM 102800 sont capables de moduler la réponse immunitaire, les inventeurs ont testé *in vitro* les propriétés immunomodulatrices des surnageants des souches dans un modèle basé sur la capacité à bloquer la production de IL-8 (une cytokine pro-inflammatoire) induite par stimulation TNF-α dans des cellules épithéliales du colon HT-29.

[0133] Ainsi, les inventeurs ont observé que les deux souches sont capables de bloquer la production d'IL-8 de la même manière que notre témoin positif (*Akkermansia* muciniphila DSMZ 22959) (Figure 1).

[0134] *Christensenella minuta* DSM 22607 et *Christensenella timonensis* DSM 102800 augmentent les propriétés anti-inflammatoires d'*Akkermansia* muciniphila DSMZ 22959 *in vitro*.

[0135] Afin de tester si les membres de Christensenella étaient capables d'augmenter les propriétés anti-inflammatoires d'autres membres du microbiote intestinal, des co-cultures avec *Akkermansia muciniphila* ont été réalisées. Comme le montre également la Figure 1, *Christensenella minuta* DSM 22607 et *Christensenella timonensis* DSM 102800 ont pu augmenter les propriétés anti-inflammatoires d'*Akkermansia muciniphila* DSMZ 22959 d'une manière statistiquement significative.

[0136] **3. Démonstration de l'effet anti-inflammatoire de bactéries *christensenella in vitro* (IL-8).**

[0137] L'objectif de cette étude est de démontrer l'effet anti-inflammatoire *in vitro* de bactéries selon l'invention. La démonstration a été réalisée sur un des marqueurs de l'inflammation : l'interleukine-8.

[0138] Le protocole opératoire de l'étude est décrit en suivant.

[0139] Lorsque les cellules HT-29 sont à confluence (environ 7 jours après ensemencement), le milieu complet (DMEM Glutamax + 10% SVF) est alors retiré pour être remplacé par du

milieu à 5% de SVF (J0). A J+1, le milieu est enlevé. Deux milieux (DMEM Glutamax + 5% SVF +/- TNF-a) sont préparés. On ajoute alors 450µL/puits d'un des deux milieux puis 50µL des surnageants à tester. Après 6 heures de co-incubation, les surnageants sont récupérés et stockés à -80°C. Des dosages par ELISA de la chimiokine IL-8 sont alors réalisés (ELISA MAX Deluxe set Human IL-8 de Biolegend).

[0140] La Figure 2 représente le dosage de la chimiokine IL-8 sécrétée par les cellules HT-29 (adénocarcinomes du côlon) dans un état inflammatoire induit par le TNF-α. Différents surnageants de bactéries (*C. minuta* 1, *C. minuta* 2, *C. minuta* 3, *C. minuta* 4 et DSMZ, correspondant à la souche DSM22607) appartenant aux bactéries de l'espèce *Christensenella minuta* ont été testés afin d'évaluer leur capacité immunomodulatrice. Le milieu de culture bactérien (GAM) représente le contrôle permettant d'apprécier les effets des surnageants. L'expérience a été réalisée quatre fois en triplicat.

[0141] Toutes les souches de *Christensenella minuta* testées ont un effet immunomodulateur anti-inflammatoire (diminution de plus de 50% du niveau d'IL-8 sécrétée), ce qui permet de confirmer le potentiel anti-inflammatoire de *Christensenella*.

[0142] **4. Démonstration de l'effet de bactéries *christensenella* sur la perméabilité de la membrane épithéliale intestinale.**

[0143] La Figure 3 représente la mesure de la résistance électrique trans-épithéliale prise sur cellules épithéliales Caco-2. Ces dernières en se différenciant établissent des jonctions entre elles (appelée les jonctions serrées) permettant de maintenir l'intégrité de cette barrière créée par les cellules, mimant la barrière intestinale présente dans notre tube digestif.

[0144] L'ajout de la cytokine TNF -α (Tumor Necrosis Factor) perturbe ces jonctions serrées, et alors augmente la perméabilité membranaire, favorisant par exemple des maladies inflammatoires ou infectieuses et diminuant ainsi le ratio TEER (groupe contrôle DMEM + TNF -α). Le groupe contrôle "DMEM -" représente les puits où seulement le milieu de culture cellulaire était présent, sans TNF -α ni bactérie.

[0145] La résistance électrique trans-épithéliale (TEER) est une méthode permettant de quantifier l'intégrité de la barrière d'un tissu épithélial en mesurant la résistance électrique à travers celui-ci. Les mesures TEER sont réalisées en plaçant des électrodes aux deux pôles d'une couche de cellules épithéliales ayant été cultivées sur une membrane semi-perméable. Les électrodes appliquent un courant alternatif permettant la mesure de la résistance électrique à travers la couche de cellules épithéliales.

[0146] Le ratio TEER est obtenu par le calcul suivant :

$$Ratio\ TEER = \frac{TEER\ traitement\ t24 / TEER\ traitement\ t0}{TEER\ témoin\ t24 / TEER\ témoin\ t0}$$

[0147] 7 jours après ensemencement de cellules Caco-2 (cellules épithéliales intestinales) dans des plaques Transwell, la TEER est mesurée à l'aide d'un automate (REMS). Les valeurs sont enregistrées et représentent notre valeur de départ (T0). Les cellules sont alors co-incubées en présence de bactéries (MOI 1/40) pendant 3 heures, le temps que celles-ci adhèrent aux cellules. Puis les cellules sont challengées avec du TNF-α induisant une perturbation de la couche de cellules épithéliales et notamment au niveau des jonctions serrées. 24h (T24) après l'ajout des bactéries, la TEER est de nouveau mesurée.

[0148] Cette figure nous montre que les bactéries *Christensenella minuta* influent sur l'intégrité de la barrière intestinale en améliorant la résistance trans-épithéliale, indiquant un potentiel effet sur les protéines de jonctions serrées et une diminution de la perméabilité intestinale. Les bactéries *Christensenella minuta* permettent donc de restaurer la résistance de la membrane épithéliale.

[0149] **5. Démonstration de l'effet anti-inflammatoire de bactéries *christensenella in vivo***

[0150] L'objectif de cette étude est de démontrer l'effet anti-inflammatoire in vivo sur souris, de bactéries selon l'invention. La démonstration a été réalisée sur des marqueurs majeurs de l'inflammation, deux cytokines : IL6 (interleukine 6) et TNF-α (facteur de nécrose tumorale-alpha). L'étude a été réalisée en aveugle : les expérimentateurs ne connaissaient pas les traitements afin que leurs connaissances antérieures n'influencent en aucun cas le résultat de l'étude.

[0151] Le protocole opératoire est décrit en suivant.

- Des souris mâles C57BL/6 âgées de quatre semaines ont été achetées auprès de Charles River (St Germain sur l'Arbresle, France).
- Les souris ont eu une période d'acclimatation d'une semaine sur le régime à base d'une alimentation standard (« chow diet (SafeA04) ») avant de commencer l'étude.
- Le premier jour (D0), les animaux ont été soumis à un régime riche en graisses (« Research Diet D12451 » 45% kcal) et répartis aléatoirement en 2 groupes (n = 5 par groupe), chacun

recevant soit une solution de 150 µL de *Christensenella minuta* (10^9 UFC/mL), soit une solution de contrôle constituée du milieu de culture utilisé pour la croissance des bactéries pendant 12 semaines. Les animaux ont eu à disposition de la nourriture et de l'eau à volonté pendant toute la durée de l'étude et ont été maintenus dans une pièce à température (22,0 ± 2,0 ° C) et humidité (40-50%) contrôlés et sur un cycle de 12h de lumière (8h-20h)/ 12h d'obscurité.

- À la fin de l'expérimentation (D85), des derniers échantillons de sang ont été prélevés sur les animaux anesthésiés (par un mélange de kétamine/xylazine 80/10 mg / kg). Les échantillons de sang ont été recueillis dans des tubes à centrifuger préremplis avec du sulfate d'héparine (200 UI / mL de sang). Le plasma a été séparé par centrifugation (3500 tr / min, 15 min, 4 ° C), collecté puis conservé à -80 ° C jusqu'à l'analyse.

- Les taux plasmatiques de cytokines IL6 et TNFα ont été déterminés à l'aide du kit de dosage ELISA « Invitrogen® Luminex® Cytokine Mouse Magnetic 10-Plex » et conformément aux instructions du fabricant. Les mesures ont été effectuées par VEBIO (Arcueil, France).

[0152] Les résultats (présentés dans le Tableau 4) de dosage des cytokines pro-inflammatoires TNFα et IL6 après 85 jours de régime riche en graisse à 45% (cal) montrent qu'une bactérie de la famille des *Christensenellacées* limite fortement l'inflammation. [Tableau 4]

Régime	Souris	TNFα (pg/mL)	Moyenne TNFα +/- SEM	IL-6 (pg/mL)	Moyenne IL6 +/- SEM
HFD45% + *C. minuta*	C9- SM		-	62,48	44.61 +/- 11.40
	C9- OG			17,00	
	C15- SM			52,17	
	C15- OG			72,73	
	C15- OD			18,68	
HFD45% + contrôle	C12- SM	2,93	3.53 +/- 0.36	89,71	117,25 +/- 28.57
	C12- OG			144,76	
	C12- OD	4,19		39,96	
	C14- SM	3,49		101,85	

	C14- OG	1,87		209,96	

[0153] **6. Démonstration de l'effet anti-inflammatoire de bactéries *christensenella in vivo***

[0154] Dès leur arrivée, les animaux sont mis en cage (n=5 par cage) et démarre une période d'acclimatation afin de permettre aux souris de se remettre du transport et en diminuant le stress en s'habituant à ce nouvel environnement. Après une semaine, les gavages de tous les groupes (excepté le groupe contrôle 5-ASA, contrôle pharmacologique anti-inflammatoire) commencent, ainsi que le suivi du poids. Les souris contrôles (ctlr-vehicle et DNBS-vehicle) sont gavées avec 150µL de PBS/16%de glycérol. Les souris DNBS- *Christensenella minuta* (*C. minuta*) sont gavées avec 150µL de *C. minuta* DSM 22607 à 10^{10} CFU/mL resuspendues dans du PBS/16% glycérol. Après deux semaines, l'inflammation est induite via un produit chimique, appelé le DNBS (dinitrobenzensulfate). Ce dernier est injecté directement dans le côlon de la souris par une sonde introduite au niveau du rectum. Le DNBS est dissout dans de l'éthanol à 30%, permettant de fragiliser la barrière intestinale pour faciliter l'entrée du DNBS dans le tissu, déclenchant ainsi le système immunitaire et donc l'inflammation. Les gavages continuent durant cette période, et ceux du groupe 5-ASA commencent le jour de cette injection à 150µL (solution de 5-ASA préparée tous les matins, à 2mg/souris resuspendue dans du PBS). L'euthanasie a lieu 3 jours après l'injection. La période dite de « recovery » est donc courte, mais nécessaire pour pouvoir observer des différences avec le groupe contrôle DNBS.

[0155] La Figure 4 représente les différents paramètres évalués lors d'un essai sur un modèle inflammatoire induit par le DNBS.

[0156] En Figure 4A, le suivi de la perte de poids a été observé à partir du jour de l'injection, et donc la période de récupération (J1, J2 et J3) qui suit. Les inventeurs ont ainsi observé un effet sur la récupération qui semble être plus rapide après l'administration du traitement.

[0157] Sur la figure 4B, les scores macroscopiques nous indiquent le niveau de sévérité de la maladie, indiquent que suite aux traitements avec DSM 22607, une diminution significative du score a été observée, de même qu'avec l'agent pharmacologique anti-inflammatoire, le 5-ASA (Acide 5-aminosalicylique utilisé comme comparatif contrôle positif).

[0158] Les figures 4C et 4D nous montrent le potentiel immunomodulateur de DSM 22607, notamment en diminuant la présence de neutrophiles dans le côlon, évalué en suivant l'activité de la myélopéroxydase. De plus, l'augmentation de l'interleukine-10 dans la rate (figure 4D) nous montre les effets anti-inflammatoires associés à *Christensenella minuta*.

[0159] **7. Démonstration de l'effet anti-inflammatoire de bactéries *christensenella in vivo***

[0160] Trois jours après l'injection, les animaux sont euthanasiés. La variation de poids des souris est mesurée en prenant le poids des souris tous les jours. Lors du sacrifice, le côlon est ouvert et nettoyé afin réaliser le score macroscopique. Ce dernier est basé sur la présence de sang dans le tissu (hyperhémie), la présence d'ulcère, le transit intestinal (par exemple si la souris était constipée) et l'épaississement du côlon induit par le DNBS.

[0161] Un morceau de côlon est également récupéré afin de doser l'activité de la myélopéroxydase (MPO). Cette enzyme est présente dans les neutrophiles, marqueurs de l'inflammation. Elle participe également à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Lors de ce test, après avoir pesé le côlon pour normaliser les résultats en fonction de la taille de l'échantillon, une réaction colorimétrique a lieu permettant de doser l'activité de cette enzyme.

[0162] La rate est également récupérée lors du sacrifice (organe lymphoïde périphérique) et les cellules de la réponse immunitaire innée et adaptatives sont stimulées afin de doser les cytokines sécrétées telles que l'IL-10, cytokines anti-inflammatoires.

[0163] La figure 5 représente les effets d'autres souches de *Christensenella minuta* lors d'une répétition de l'expérience présentée en Figure 4. Le design expérimental et les méthodes restent similaires. Cette expérience nous apprend que toutes les souches de *Christensenella minuta* testées ont la même efficacité quant à la réduction des scores macroscopiques suite à l'injection intra-rectale de DNBS. De même, toutes les souches testées montrent un effet anti-inflammatoire qui se traduit par une réduction de l'activité de la MPO.

[0164] **8. Démonstration de l'effet anti-prolifératif de bactéries *christensenella***

[0165] Les cellules HT-29 ont été ensemencées à une densité de 10000 cellules/ puits dans un volume total de 100 µl en plaque 96-puits. Après 24h d'incubation, le milieu de culture a été retiré des cellules adhérentes et du nouveau milieu supplémenté avec 10% de surnageant en phase stationnaire de *Christensenella minuta* a été ajouté (DSMZ, *C. minuta* 1 et *C. minuta* 2 et en contrôle GAM (milieu de culture bactérien)). Chaque condition a été faite en 4 réplicats. Les cellules ont été incubées pendant 48h ou 72h supplémentaires.

[0166] La prolifération cellulaire a été déterminée par l'utilisation du kit CellTiter-Glo 2.0 assay (Promega). Les mesures ont été réalisées selon les instructions du fabricant. Brièvement, les plaques ont été retirées de l'incubateur et laissées s'équilibrer à température ambiante pendant 30 min et un volume égal de réactif CellTiter-Glo 2.0 a été ajouté

directement aux puits (100 µl). Les plaques ont été mises sous agitation à 300 tr / min pendant 2 min en utilisant un agitateur rotatif, puis incubées à température ambiante pendant 10 min. Le mélange réactionnel a ensuite été transféré dans une plaque à 96 puits à paroi blanche et le signal luminescent a été mesuré à l'aide d'un lecteur de microplaques (FLUOstar Omega, BMG Labtech).

[0167] La Figure 6 représente l'influence de souches de *Christensenella minuta* sur la prolifération de cellules tumorales.

[0168] Les inventeurs ont observé l'influence de souches de *Christensenella minuta* sur la prolifération de cellules tumorales, nous avons analysé l'effet de ces surnageants par traitement d'une lignée cellulaire humaine d'adénocarcinome du côlon, la lignée HT-29. L'effet des surnageants de *Christensenella minuta* sur la prolifération des cellules HT-29 a été évalué après 48 et 72h. Les surnageants des souches DSM22607 (DSMZ), *C. minuta* 1 et *C. minuta* 2 réduisent significativement la prolifération des cellules traitées pendant 48h et 72h, par rapport au contrôle "GAM", correspondant aux cellules traitées avec le milieu de culture bactérien (Test statistique = Dunnett où le groupe contrôle est le GAM ; ****GAM vs DSMZ $p<0.0001$, *GAM vs *C. minuta 1* $p=0.0140$, **GAM vs *C. minuta* 2 $p = 0.0027$ à 48h and ****$p<0.0001$ à 72h). L'inhibiteur VIII d'Akt est utilisé comme contrôle du blocage de la prolifération cellulaire.

[0169] Cette expérience permet de conclure que les surnageants des différentes souches de *Christensenella minuta* testés induisent une diminution de la prolifération de la lignée tumorale HT-29, et donc un rôle de ces souches dans l'inhibition du développement tumoral.

REVENDICATIONS

[Revendication 1] Bactérie du genre *Christensenella* pour son utilisation dans la prévention et/ou le traitement de maladies inflammatoires chroniques et/ou maladies gastro-intestinales inflammatoires et/ou de cancers chez l'être humain ou l'animal.

[Revendication 2] Bactérie du genre *Christensenella* pour son utilisation selon la revendication 1, chez des patients ou des animaux présentant une hyperproduction d'interleukine 6 et/ou d'interleukine 8 et/ou une sous-production d'interleukine 10.

[Revendication 3] Bactérie du genre *Christensenella* pour son utilisation selon l'une des précédentes revendications, dans le traitement d'au moins une maladie choisie parmi les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, les maladies inflammatoires chroniques du foie, les maladies inflammatoires chroniques du pancréas, les polyarthrites, les dermatites atopiques, les maladies neuro-inflammatoires, de la bronchopneumopathie chronique obstructive et les affections intestinales inflammatoires.

[Revendication 4] Bactérie du genre *Christensenella* pour son utilisation selon la précédente revendication, dans le traitement d'au moins une maladie choisie parmi la maladie de Crohn, la recto-colite hémorragique, la pochite, la colite ulcéreuse, la maladie coeliaque, la gastrite auto-immune, les hépatites, la stéatohépatite non alcoolique, la cholangite sclérosante primitive, la pancréatite, la polyarthrite rhumatoïde, la polyarthrite psoriatique, le psoriasis et l'eczéma.

[Revendication 5] Bactérie du genre *Christensenella* pour son utilisation selon l'une des revendications 1 ou 2, pour une utilisation dans le traitement des lymphomes, les glioblastomes, les myélomes, les leucémies, les cancers colorectaux, les cancers du sein, les cancers de la prostate, les cancers de l'ovaire, les cancers de l'utérus, les cancers du pancréas, les cancers des poumons, les cancers du foie, les cancers de la vésicule biliaire et les cancers des reins.

[Revendication 6] Bactérie du genre *Christensenella* pour son utilisation selon l'une des précédentes revendications, caractérisée en ce que ladite bactérie est choisie parmi *Christensenella massiliensis, Christensenella timonensis, Christensenella intestinihominis,* et *Christensenella minuta.*

[Revendication 7] Composition comprenant au moins une bactérie du genre *Christensenella* selon l'une des précédentes revendications dans un milieu physiologiquement acceptable et/ou un surnageant de culture d'au moins une souche

bactérienne du genre *Christensenella* pour une utilisation, dans la prévention et/ou le traitement de maladies inflammatoires chroniques et/ou de maladies gastro-intestinales inflammatoires et/ou de cancers.

[Revendication 8] Composition pour son utilisation selon la revendication 7, dans laquelle ladite bactérie du genre Christensenella et ledit surnageant de culture peuvent comprendre ou être dérivés de la même ou de différentes souches ou espèces de Christensenella

[Revendication 9] Composition pour son utilisation selon l'une des revendications 7 ou 8, ladite composition est administrée à l'être humain possédant un indice de masse corporel inférieur à 25.

[Revendication 10] Composition pour son utilisation selon l'une des revendications 7 ou 9, caractérisée en ce que ladite bactérie est choisie parmi *Christensenella massiliensis, Christensenella timonensis* et *Christensenella minuta* et/ou leurs mélanges.

[Revendication 11] Composition pour son utilisation selon l'une des revendications 7 à 10, caractérisée en ce que les bactéries présentes sont pour au moins 50% des bactéries vivantes (en nombre).

[Revendication 12] Composition pour son utilisation selon l'une des revendications 7 à 11, caractérisée en ce que les bactéries présentes sont pour au moins 90% des bactéries vivantes (en nombre).

[Revendication 13] Composition pour son utilisation selon l'une des revendications 7 à 12, comprenant en outre :

(i) au moins une bactérie additionnelle de la famille *Verrucomicrobiaceae ;* et/ou

(ii) un surnageant de culture de ladite bactérie additionnelle.

[Revendication 14] Composition pour son utilisation selon la revendication 13, dans laquelle la souche bactérienne additionnelle est une bactérie du genre *Akkermansia*, plus particulièrement de l'espèce *Akkermansia muciniphila*.

[Revendication 15] Composition pour son utilisation selon l'une des revendications 7 à 14, caractérisée en ce qu'elle se présente sous forme liquide ou sous forme solide.

[Revendication 16] Composition pour son utilisation selon la revendication 15, caractérisée en ce que la composition sous forme solide comprend lesdites bactéries sous forme lyophilisée.

[Revendication 17] Composition pour son utilisation selon l'une des revendications 7 à 16, dans laquelle la composition est administrée par voie orale, rectale, inhalée ou topique.

[Revendication 18] Composition pour son utilisation selon l'une des revendications 7 à 17, caractérisée en ce qu'elle se présente sous forme de poudre, de poudre microencapsulée, de gélule, de capsule, de comprimé, de pastille, de granulés, d'émulsion, de suspension, de suppositoire, d'un produit alimentaire, d'une boisson, d'un produit pharmaceutique, d'un nutraceutique, d'un additif alimentaire, d'un complément alimentaire ou d'un produit laitier.

[Revendication 19] Composition pour son utilisation selon l'une des revendications 7 à 18, caractérisée en ce qu'elle se présente sous une forme gastro-résistante.

[Revendication 20] Composition pour son utilisation selon l'une des revendications 7 à 19, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un probiotique et/ou au moins un prébiotique.

[Revendication 21] Composition pour son utilisation selon l'une des revendications 7 à 20, caractérisée en ce qu'elle comprend également :

- au moins un probiotique, et/ou
- au moins une bactérie produisant de l'acide lactique et/ou au moins un autre organisme favorisant les conditions anaérobiques nécessaires à la survie des *Christensenellacées*, et/ou
- au moins une bactérie associée à l'écosystème des *Christensenellacées*, et/ou
- au moins une bactérie choisie parmi les bactéries du genre *Faecalibacterium*, *Akkermansia*, *Eubacterium* et *Oscillospira*, et/ou
- au moins un prébiotique, et/ou
- au moins un polyphénol, et/ou
- au moins un minéral et/ou au moins une vitamine et/ou au moins un agent nutritionnel, et/ou
- au moins un principe actif pharmaceutique préférentiellement choisi parmi les anti-inflammatoires non stéroïdien, les anticorps dirigés contre des cibles pro-inflammatoires (anti-TNFalpha, anti-IL-6, anti-IL-8), les antirhumatismaux, les analgésiques, les antimicrobiens, les corticostéroïdes, les anaboliques stéroïdiens, les antidiabétiques, les agents thyroïdiens, les antidiarrhéiques, les antitussifs, les antiémétiques, les anti ulcères, les laxatifs, les anticoagulants, l'érythropoïétine, les immunoglobulines, les

immunosuppresseurs, les hormones de croissance, les médicaments hormonaux, les modulateurs des récepteurs aux œstrogènes, les agents alkylant, les antimétabolites, les inhibiteurs mitotiques, les radiopharmaceutiques, les anti-dépresseurs, les antipsychotiques, les anxiolytiques, les hypnotiques, les sympathomimétiques, les stimulants, le donepezil, la tacrine, les médicaments pour l'asthme, les bêta-agonistes, les stéroïdes inhalés, les inhibiteurs de leucotriène, les cromoglycates ou acides cromoglycidiques, l'épinéphrine, la dornase alpha, les cytokines, les antagonistes de cytokines, les agonistes d'interleukine 10.

[Revendication 22] Composition comprenant, dans un milieu physiologiquement acceptable :

(I) (a) au moins une souche bactérienne choisie dans le groupe constitué de *Christensenella timonensis*, *Christensenella minuta* et/ou leurs mélanges ;
et/ou
(b) au moins un surnageant de culture d'au moins une souche bactérienne choisie dans le groupe constitué de *Christensenella timonensis*, *Christensenella minuta* et/ou leurs mélanges ;

et

(II) (a) au moins une souche bactérienne additionnelle du genre *Akkermansia*, plus particulièrement de l'espèce *Akkermansia muciniphila* ;
et/ou
(b) au moins un surnageant de culture d'au moins une souche bactérienne additionnelle du genre *Akkermansia*, plus particulièrement de l'espèce *Akkermansia muciniphila*.