(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

COURBEVOIE

(11) **N° de publication :** **3 058 142**

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

(21) **N° d'enregistrement national :** **16 60521**

(51) Int Cl[8] : ***C 07 K 14/78*** *(2016.01), A 23 J 1/04, A 23 J 3/34, A 23 L 33/18, A 61 K 35/60, A 61 K 38/01, A 61 P 1/00*

(12) **BREVET D'INVENTION** **B1**

(54) COMPOSITION DE PEPTIDES DE COLLAGENE DE PEAU DE POISSON ET SON UTILISATION A TITRE DE MEDICAMENT.

(22) **Date de dépôt :** 28.10.16.

(30) **Priorité :**

(43) **Date de mise à la disposition du public de la demande :** 04.05.18 Bulletin 18/18.

(45) **Date de la mise à disposition du public du brevet d'invention :** 24.11.23 Bulletin 23/47.

(56) **Liste des documents cités dans le rapport de recherche :**

Se reporter à la fin du présent fascicule

(60) **Références à d'autres documents nationaux apparentés :**

(○) **Demande(s) d'extension :**

(71) **Demandeur(s) :** *GELATINES WEISHARDT Société par actions simplifiée* — FR.

(72) **Inventeur(s) :** BRUNO-BONNET CHRISTELLE, AUFFRET YANNICK, JOLIMAITRE-ROBERT PASCALE et CORBILLE PATRICE.

(73) **Titulaire(s) :** GELATINES WEISHARDT Société par actions simplifiée.

(74) **Mandataire(s) :** NOVAGRAAF TECHNOLOGIES.

FR 3 058 142 - B1

COMPOSITION DE PEPTIDES DE COLLAGÈNE DE PEAU DE POISSON ET SON UTILISATION À TITRE DE MÉDICAMENT

L'invention concerne une composition de peptides de collagène de peau(x) de poisson(s). L'invention concerne en particulier une telle composition de peptides obtenue par hydrolyse enzymatique de collagène de peau(x) de poisson(s). L'invention concerne également une telle composition pour son utilisation à titre de médicament. L'invention concerne donc l'utilisation d'une telle composition pour le traitement curatif ou préventif d'une pathologie affectant le corps humain ou animal. L'invention concerne en particulier une telle composition pour son utilisation à titre de médicament dans le traitement d'une candidose digestive chez l'homme ou l'animal et/ou dans le traitement d'une inflammation intestinale chez l'homme ou l'animal. L'invention concerne également une telle composition pour son utilisation à titre de médicament dans un traitement stimulant du microbiote.

On connait de FR 2 720 067 une poudre de peptides obtenue par hydrolyse par la papaïne d'une matière première riche en collagène, provenant de la peau ou du squelette de poissons, de mollusques ou de crustacés. Dans la poudre de peptides obtenue, 38 % des peptides présentent un poids moléculaire compris entre 10 000 Da et 50 000 Da. La composition de peptides de FR 2 720 067 présente une large gamme de poids moléculaires, en particulier une proportion supérieure à 10 % de peptides dont le poids moléculaire est supérieur à 10 000 Da. La composition de peptides de FR 2 720 067 est hétérogène par la taille des peptides et présente une fraction hydrosoluble comprise entre 80% et 90%. De telles poudres de peptides de haut poids moléculaire supérieur à 10 000 Da ne sont pas parfaitement hydrosolubles. Elles ne sont également pas totalement absorbables par le tube digestif et posent donc le problème de leur biodisponibilité.

FR 2 720 067 décrit aussi l'utilisation d'une telle poudre de peptides obtenue à partir de poissons vivants dans les grandes profondeurs dans le traitement curatif d'une inflammation des tendons des articulations des membres inférieurs (genoux, boulets et sabots) de chevaux de course.

L'obtention d'une telle composition pose problème. Elle nécessite en effet le prélèvement de poissons abyssaux. En outre, une telle poudre est limitée dans son utilisation au traitement d'une inflammation articulaire.

L'invention vise donc à pallier ces inconvénients.

L'invention vise à proposer une nouvelle composition de peptides issue d'une hydrolyse enzymatique de collagène de peau(x) de poisson(s) d'eaux tempérées, lesdits peptides étant hydrosolubles -c'est à dire hydrosolubles à 100%- et totalement absorbables par le tube digestif.

L'invention vise également à proposer une nouvelle composition de peptides formée par hydrolyse enzymatique de collagène de peau(x) de poisson(s) d'eaux tempérées.

L'invention vise aussi à proposer une telle composition de peptides susceptible de pouvoir être utilisée comme médicament.

L'invention vise en particulier à proposer une telle composition de peptides issue d'une hydrolyse enzymatique de collagène de peau(x) de poisson(s) d'eaux tempérées et susceptible de pouvoir être utilisée comme médicament.

L'invention vise à proposer une telle composition de peptides présentant en même temps une distribution de leurs poids moléculaires apparents s'étendant sur un intervalle étroit compris entre une centaine et quelques milliers de daltons, c'est-à-dire excluant des peptides de haut poids moléculaires apparents, et présentant également une proportion faible de peptides de bas poids moléculaires apparents.

L'invention vise à proposer une telle composition de peptides susceptible de pouvoir être utilisée comme médicament dans le traitement de la candidose intestinale.

L'invention vise également à proposer une telle composition de peptides susceptible de pouvoir être utilisée comme médicament dans le traitement de maladies inflammatoires digestives, notamment de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI).

L'invention vise également à proposer une telle

composition de peptides susceptible de pouvoir être utilisée pour favoriser l'équilibre et le maintien de la flore (ou microbiote) intestinale.

L'invention vise également à proposer l'utilisation d'une telle composition de peptides issue d'une hydrolyse enzymatique de collagène de peau(x) de poisson(s) d'eaux tempérées à titre de complément alimentaire.

Pour ce faire, l'invention concerne une composition de peptides présentant un aminogramme dans lequel :

- la glycine est en quantité molaire telle que le rapport de cette quantité sur la somme des quantités molaires des acides aminés dans la composition est compris entre 20,0 % et 24,5 % ;
- l'hydroxyproline est en quantité molaire telle que le rapport de cette quantité sur la somme des quantités molaires des acides aminés dans la composition est compris entre 6,0 % et 12,0 %, notamment compris entre 7,0 % et 11,0 % ;
- la proline est en quantité molaire telle que le rapport de cette quantité sur la somme des quantités molaires des acides aminés dans la composition est compris entre 10,6 % et 14,6 %, notamment compris entre 11,6 % et 13,6 %, en particulier compris entre 12,1 % et 13,1 %, de préférence de l'ordre de 12,6 % ;

la composition de peptides présentant, lors d'une analyse par chromatographie d'exclusion lors de laquelle chaque peptide de la composition de peptides est élué avec un temps de rétention représentatif du poids moléculaire apparent de ce peptide, une courbe d'élution (c'est-à-dire une courbe d'élution d'un chromatogramme) des peptides présentant une valeur d'aire sous la courbe (c'est-à-dire une valeur d'aire représentative de la quantité massique de peptides) correspondant aux peptides de poids moléculaire apparent inférieur à 1400 Da telle que le rapport de cette valeur d'aire sur l'aire totale sous la courbe (correspondant à l'ensemble des peptides de la composition) est inférieur à 40 %, notamment inférieur à 38 %, de préférence compris entre 30% et 38%, en particulier compris entre 30 % et 35 % ;

ladite analyse étant réalisée comme décrit ci-après ;

- sur une colonne de filtration de dimensions 300 x 7,8 mm comprenant

une phase stationnaire formée d'un gel de silice d'une porosité de 5 µm ;

- la colonne étant maintenue à la température de 40°C ;
- avec, à titre de phase mobile, une solution formée (A) d'eau ultra pure comprenant 0,1% en volume d'acide trifluoroacétique et (B) d'acétonitrile, dans laquelle le rapport volumique A/B est de 75/25 ;
- en introduisant en tête de la colonne de filtration sur gel un volume d'une solution comprenant de la composition de peptides ;
- le débit de la phase mobile dans la colonne étant de 0,6 mL/min, et ;
- les peptides de la composition étant détectés par absorbance à la longueur d'onde de 214 nm.

Dans tout le texte, on entend par « aminogramme », la liste des acides aminés libres formant par enchainement (ou liaison) peptidique la séquence d'un peptide ou les séquences des peptides d'un mélange de peptides. Un tel aminogramme est obtenu par analyse -notamment par analyse globale ou par analyse séquentielle- des acides aminés constitutifs d'un peptide ou d'un mélange de peptides.

En particulier, on détermine la nature et la quantité des acides aminés constitutifs des peptides de la composition selon l'invention par toute méthode d'analyse globale connue en elle-même de l'homme du métier. En particulier, on réalise cette analyse conformément à la norme ISO 13903:2005 par dosage des acides aminés libres et totaux au moyen d'un analyseur d'acides aminés ou au moyen d'un équipement de chromatographie liquide à haute performance (CLHP). L'hydroxyproline est dosée par analyse en flux continu et détection colorimétrique.

L'aminogramme obtenu par analyse globale de la composition selon l'invention est représentatif de la composition en acides aminés de collagène de peaux de poissons d'eaux tempérées. L'invention concerne donc une telle composition de peptides issue d'une hydrolyse enzymatique de collagène de peaux de poissons d'eaux tempérées par une protéase à cystéine d'origine végétale -notamment une protéase de la classe EC 3.4.22.2-. Les inventeurs ont découvert que l'utilisation d'une telle protéase à

cystéine permet d'obtenir une composition de peptides qui sont hydrosolubles -c'est à dire hydrosolubles à 100%- et qui sont totalement absorbables par le tube digestif et qui présentent une répartition de poids moléculaires apparents qui s'étend sur un intervalle étroit compris entre une centaine et quelques milliers de daltons, c'est-à-dire excluant des peptides de haut poids moléculaires apparents, et présentant également une proportion faible de peptides de bas poids moléculaires apparents.

En outre, on réalise une séparation des peptides de la composition de peptides selon l'invention en fonction de leur poids moléculaire apparent en soumettant la composition de peptides à une étape de séparation analytique par chromatographie liquide sur une colonne de filtration sur gel de silice (BioSep-SEC-S2000, Phenomenex, Le Peck, France) poreuse et de haute densité surfacique en groupements silanols.

On utilise à titre de phase mobile une solution comprenant (A) de l'eau ultra pure additionnée d'acide trifluoroacétique (0,1% en volume) et (B) de l'acétonitrile (A/B ; 75/25 ; v/v). La colonne de filtration sur gel est maintenue à la température de 40°C pendant l'analyse. Le débit de la phase mobile dans la phase stationnaire est de 0,6 mL/min. Le volume de composition de peptides à analyser introduite en tête de colonne de gel filtration est de 25 µL et la détection et réalisée en continu par absorbance à la longueur d'onde de 214 nm. On obtient un chromatogramme sur lequel chaque pic est caractérisé par une valeur de durée ou de temps de rétention (exprimée en minutes suivant l'introduction du mélange à analyser en tête de colonne) déterminée à la valeur maximale d'absorbance du pic. On détermine le poids moléculaire apparent de chaque peptide correspondant à cette valeur de temps de rétention à la valeur maximale d'absorbance de chaque pic au moyen d'une courbe d'étalonnage prédéterminée obtenue par analyse -dans les mêmes conditions chromatographiques que décrite ci-dessus- de peptides de poids moléculaires apparents déterminés. On réalise par exemple une telle courbe d'étalonnage avec un mélange de peptides/protéines de référence et de poids moléculaires apparents connus et compris entre 100 Da et 30 kDa.

Le chromatogramme représentant la variation d'absorbance à 214 nm au cours de l'analyse chromatographique de la composition de peptides selon l'invention, on détermine la proportion de peptides de poids moléculaire apparent inférieur à 1400 Da en évaluant le rapport de la valeur de l'aire s'étendant sous la courbe -c'est-à-dire la valeur de la somme des aires s'étendant sous les pics de la courbe- correspondant aux peptides de poids moléculaire apparent inférieur à 1400 Da sur la valeur de l'aire totale s'étendant sous la totalité de la courbe -c'est-à-dire la valeur de la somme des aires s'étendant sous chaque pic de la courbe- et correspondant à l'ensemble des peptides de la composition de peptides.

L'invention concerne donc une composition de peptides issus d'une hydrolyse enzymatique de collagène de peaux de poissons d'eaux tempérées par une protéase à cystéine d'origine végétale, chaque peptide de la composition présentant un nombre d'acides aminés compris entre 2 et quelques dizaines, de préférence compris entre 2 acides aminés et 100 acides aminés.

Dans certains modes de réalisation, la composition selon l'invention présente un aminogramme dans lequel la glycine est en quantité molaire telle que le rapport de cette quantité sur la somme des quantités molaires des acides aminés dans la composition est compris entre 20,0 % et 22,4 %, notamment compris entre 20,0 % et 21,9 %, en particulier compris entre 20,4 % et 21,4 %.

Dans certains autres modes de réalisation, la composition selon l'invention présente un aminogramme dans lequel la glycine est en quantité molaire telle que le rapport de cette quantité sur la somme des quantités molaires des acides aminés dans la composition est compris entre 22,4 % et 24,9 %, notamment compris entre 22,9 % et 24,4 %, en particulier compris entre 23,0 % et 24,0 %.

Dans certains modes de réalisation, la composition selon l'invention présente un aminogramme dans lequel l'hydroxyproline est en quantité molaire telle que le rapport de cette quantité sur la somme des quantités molaires des acides aminés dans la composition est compris entre 7,0 % et 9,0 %,

en particulier compris entre 7,5 % et 8,5 %, de préférence compris entre 7,7 % et 8,5 %.

Dans certains autres modes de réalisation, la composition selon l'invention présente un aminogramme dans lequel l'hydroxyproline est en quantité molaire telle que le rapport de cette quantité sur la somme des quantités molaires des acides aminés dans la composition est compris entre 9,5 % et 11,5 %, en particulier compris entre 10,0 % et 11,0 %, de préférence de l'ordre de 10,5 %.

Dans certains modes de réalisation, la composition selon l'invention présente un aminogramme dans lequel l'acide glutamique est en quantité molaire telle que le rapport de cette quantité sur la somme des quantités molaires des acides aminés dans la composition est compris entre 8,0 % et 13,0 %.

Dans certains modes de réalisation, la composition selon l'invention présente un aminogramme dans lequel l'acide glutamique est en quantité molaire telle que le rapport de cette quantité sur la somme des quantités molaires des acides aminés dans la composition est compris entre 8,0 % et 10,0 %, en particulier compris entre 8,5 % et 9,5 %, de préférence compris entre 9,0 % et 9,5 %.

Dans certains autres modes de réalisation, la composition selon l'invention présente un aminogramme dans lequel l'acide glutamique est en quantité molaire telle que le rapport de cette quantité sur la somme des quantités molaires des acides aminés dans la composition est compris entre 10,5 % et 12,5 %, en particulier compris entre 11,0 % et 12,0 %, de préférence de l'ordre de 11,6 %.

Dans certains modes de réalisation, la composition selon l'invention présente un aminogramme dans lequel l'arginine est en quantité molaire telle que le rapport de cette quantité sur la somme des quantités molaires des acides aminés dans la composition est compris entre 6,9 % et 10,9 %, notamment compris entre 7,9 % et 9,9 %, en particulier compris entre 8,0 % et 9,0 %.

Dans certains modes de réalisation, la composition selon l'invention présente un aminogramme dans lequel l'alanine est en quantité molaire telle que le rapport de cette quantité sur la somme des quantités molaires des acides aminés dans la composition est compris entre 7,3 % et 11,5 %, notamment compris entre 8,0 % et 10,0 %, en particulier compris entre 8,1 % et 9,6 %.

Dans certains modes de réalisation, la composition selon l'invention présente un aminogramme dans lequel l'acide aspartique est en quantité molaire telle que le rapport de cette quantité sur la somme des quantités molaires des acides aminés dans la composition est compris entre 3,1 % et 7,1 %, notamment compris entre 4,1 % et 6,1 %, en particulier compris entre 4,6 % et 5,6 %, de préférence compris entre 5,0 % et 5,5 %.

Dans certains modes de réalisation, la composition selon l'invention présente un aminogramme dans lequel la lysine est en quantité molaire telle que le rapport de cette quantité sur la somme des quantités molaires des acides aminés dans la composition est compris entre 1,5 % et 5,5 %, notamment compris entre 2,5 % et 4,5 %, en particulier compris entre 3,0 % et 4,0 %, de préférence compris entre 3,1 % et 3,6 %.

Dans certains modes de réalisation, la composition selon l'invention présente un aminogramme dans lequel la sérine est en quantité molaire telle que le rapport de cette quantité sur la somme des quantités molaires des acides aminés dans la composition est compris entre 1,5 % et 5,5 %, notamment compris entre 2,5 % et 4,5 %, en particulier compris entre 3,0 % et 4,0 %, de préférence compris entre 3,2 % et 3,6 %.

Dans certains modes de réalisation, la composition selon l'invention présente un aminogramme dans lequel la thréonine est en quantité molaire telle que le rapport de cette quantité sur la somme des quantités molaires des acides aminés dans la composition est compris entre 0,7 % et 4,7 %, notamment compris entre 1,7 % et 3,7 %, en particulier compris entre 2,2 % et 3,2 %, de préférence compris entre 2,4 % et 2,8 %.

Dans certains modes de réalisation, la composition selon

l'invention présente un aminogramme dans lequel la leucine est en quantité molaire telle que le rapport de cette quantité sur la somme des quantités molaires des acides aminés dans la composition est compris entre 0,6 % et 4,6 %, notamment compris entre 1,6 % et 3,6 %, en particulier compris entre 2,1 % et 3,1 %, de préférence compris entre 2,4 % et 2,9 %.

Dans certains modes de réalisation, la composition selon l'invention présente un aminogramme dans lequel la phénylalanine est en quantité molaire telle que le rapport de cette quantité sur la somme des quantités molaires des acides aminés dans la composition est compris entre 0,3 % et 4,3 %, notamment compris entre 1,3 % et 3,3 %, en particulier compris entre 1,8 % et 2,8 %, de préférence compris entre 1,8 % et 2,4 %.

Dans certains modes de réalisation, la composition selon l'invention présente un aminogramme dans lequel la valine est en quantité molaire telle que le rapport de cette quantité sur la somme des quantités molaires des acides aminés dans la composition est compris entre 0 % et 4,0 %, notamment compris entre 1,0 % et 3,0 %, en particulier compris entre 1,5 % et 2,5 %, de préférence compris entre 1,8 % et 2,5 %.

Dans certains modes de réalisation, la composition selon l'invention présente un aminogramme dans lequel l'isoleucine est en quantité molaire telle que le rapport de cette quantité sur la somme des quantités molaires des acides aminés dans la composition est compris entre 0 % et 3,5 %, notamment compris entre 0,5 % et 2,5 %, en particulier compris entre 0,9 % et 2,0 %, de préférence compris entre 0,9 % et 1,6 %.

Dans certains modes de réalisation, la composition selon l'invention présente un aminogramme dans lequel l'hydroxylysine est en quantité molaire telle que le rapport de cette quantité sur la somme des quantités molaires des acides aminés dans la composition est compris entre 0 % et 3,5 %, notamment entre 0,5 % et 2,5 %, en particulier entre 1,0 % et 2,0 %, de préférence de l'ordre de 1,5 %.

Dans certains modes de réalisation, la composition selon l'invention présente un aminogramme dans lequel l'histidine est en quantité

molaire telle que le rapport de cette quantité sur la somme des quantités molaires des acides aminés dans la composition est compris entre 0 % et 3,3%, notamment compris entre 0 % et 2,3 %, en particulier compris entre 0,5 % et 1,5 .

Dans certains modes de réalisation, la composition selon l'invention présente un aminogramme dans lequel la méthionine est en quantité molaire telle que le rapport de cette quantité sur la somme des quantités molaires des acides aminés dans la composition est compris entre 0 % et 2,5 %, notamment compris entre 0 % et 2,0 %, en particulier compris entre 0,5 % et 1,8 %, de préférence compris entre 0,7 % et 1,6 %.

Dans certains modes de réalisation, la composition selon l'invention présente un aminogramme dans lequel la tyrosine est en quantité molaire telle que le rapport de cette quantité sur la somme des quantités molaires des acides aminés dans la composition est compris entre 0 % et 1,5 %, notamment compris entre 0 % et 1,0 %, en particulier compris entre 0 % et 0,9 %, de préférence compris entre 0,2 % et 0,8 %.

Dans certains modes de réalisation, la composition selon l'invention présente un aminogramme dans lequel la cystéine et la cystine sont ensembles en quantité molaire telle que le rapport de cette quantité sur la somme des quantités molaires des acides aminés dans la composition est compris entre 0 % et 2 %, notamment entre 0 % et 1,0 %, en particulier entre 0 % et 0,5 %, de préférence de l'ordre de 0,03 %.

La composition selon l'invention présente un aminogramme dans lequel les acides aminés essentiels (la lysine, la méthionine, la phénylalanine, la thréonine, la valine, la leucine et l'isoleucine et l'histidine) sont ensembles compris entre 15 % et 20 %.

Avantageusement, dans certains modes de réalisation selon l'invention, chaque peptide de la composition présente un poids moléculaire apparent compris entre 200 Da et 12 000 Da. Les peptides de la composition selon l'invention présentent une répartition de poids moléculaires apparents resserrée s'étendant sur un intervalle étroit compris entre une centaine et quelques milliers de daltons, c'est-à-dire excluant des peptides de haut poids

moléculaires apparents présentant plus de 100 acides aminés, et présentant également une proportion faible de peptides de bas poids moléculaires apparents.

Avantageusement, dans certains modes de réalisation selon l'invention, les peptides de la composition présentent une valeur de poids moléculaire apparent moyen comprise entre 2 500 Da et 3 600 Da, notamment comprise entre 2700 Da et 3600 Da. Chaque peptide de la composition de peptides selon l'invention présentant une contribution massique dans la composition, la valeur du poids moléculaire apparent moyen de peptides de la composition correspond à la moyenne de chaque valeur, dite valeur pondérée, du poids moléculaire apparent de chaque peptide pondérée par une valeur représentative de la contribution massique de chaque peptide dans la composition. La valeur représentative de la contribution massique de chaque peptide ou groupe de peptides dans la composition est exprimée en pourcentage de la valeur de l'aire sous la courbe correspondant audit peptide ou audit groupe de peptides sur la valeur de l'aire totale sous la courbe correspondant à l'ensemble des peptides de la composition.

En pratique, la valeur du poids moléculaire apparent pondéré d'un groupe de peptides correspondant à un même pic d'un chromatogramme correspond à la valeur du poids moléculaire apparent relevée au sommet (maximum) de ce pic du chromatogramme, multipliée par le rapport de la valeur de l'aire s'étendant sous la courbe de ce pic sur l'aire (totale) s'étendant sous la courbe du chromatogramme. On entend par « aire s'étendant sous la courbe » ou « aire sous la courbe » ou « aire s'étendant sous le pic » ou « aire sous le pic », l'aire de la surface s'étendant entre la courbe décrivant le pic du chromatogramme et la ligne de base du chromatogramme. En particulier, l'aire sous l'un des pics du chromatogramme s'étend entre deux minima de la courbe du chromatogramme encadrant un sommet (ou maximum) de la courbe du chromatogramme.

Avantageusement, la composition selon l'invention, présente par analyse chromatographique sur une colonne échangeuse d'anions lors de laquelle chaque peptide de la composition de peptides est élué de la

colonne avec un temps de rétention représentatif de sa charge :

- une valeur d'aire sous un pic correspondant aux peptides anioniques ;
- une valeur d'aire sous un pic correspondant aux peptides neutres, et ;
- une valeur d'aire sous un pic correspondant aux peptides cationiques ;

telle que le rapport de cette valeur d'aire sous le pic correspondant aux peptides anioniques sur la somme des valeurs des aires sous les pics correspondants aux peptides anioniques, aux peptides neutres et aux peptides cationiques de la composition est compris entre 27,0 % et 45 %, notamment compris entre 30 % et 45 %, en particulier compris entre 35 % et 43 %, de préférence compris entre 35 % et 40 %;

la valeur de l'aire sous le pic correspondant aux peptides anioniques, la valeur de l'aire sous le pic correspondant aux peptides cationiques et la valeur de l'aire sous le pic correspondant aux peptides neutres étant déterminées par l'analyse chromatographique dans des conditions décrites ci-après :

- o en utilisant une colonne chromatographique de dimensions 100 x 7,8 mm comprenant à titre de phase stationnaire une résine hydrophile échangeuse d'anions fonctionnalisée par des groupements ammonium quaternaires, et de granulométrie de 10 µm ;
- o en utilisant à titre de première phase mobile d'élution des peptides cationiques et des peptides neutres, un tampon (C) aqueux Tris 5 mM à pH 8,35 pendant une durée de 7 minutes à compter de l'introduction en tête de colonne de la composition à analyser, puis une deuxième phase mobile d'élution des peptides anioniques dans laquelle le rapport du volume d'un tampon (D) formé de Tris 5mM, NaCℓ 5 M à pH 8,35 sur le volume de tampon (C) augmente linéairement de 0 % à 100 % en 30 minutes ;
- o avec un débit de la phase mobile de 1 mL/min dans la colonne ;
- o l'analyse étant réalisée à une température de 25°C, et ;
- o avec une détection par absorbance à la longueur d'onde de 214 nm en sortie de colonne.

Avantageusement selon l'invention, les peptides de la composition selon l'invention présentent lors d'une analyse d'hydrophobie par

chromatographie liquide en phase inverse, un temps de rétention compris entre 16 min et 36 min ;

ladite analyse d'hydrophobie étant réalisée dans les conditions ci-après :

- en utilisant une colonne de chromatographie de dimensions 250 x 4,6 mm présentant une phase stationnaire formée de silice greffée par des groupements butyle, d'une valeur de granulométrie de 5 µm et d'une valeur de porosité de 300 Å ;
- en utilisant à titre de première phase mobile d'élution des peptides hydrophiles, une solution (E) d'acide trifluoroacétique à 0,1% dans l'eau ultrapure pendant une durée de 7 minutes à compter de l'introduction en tête de colonne de la composition à analyser, puis une deuxième phase mobile d'élution des peptides hydrophobes dans laquelle le rapport du volume d'une solution (F) d'acide trifluoroacétique à 0,1% (en volume) dans l'eau comprenant 40% d'acétonitrile sur le volume de la solution (E) augmente linéairement de 0 % à 40 % en 30 minutes ;
- avec un débit de la phase mobile de 0,6 mL/min dans la colonne ;
- l'analyse étant réalisée à une température de 40°C, et ;
- avec une détection par absorbance à la longueur d'onde de 214 nm en sortie de colonne.

Dans certains modes de réalisation, une composition selon l'invention comprend des peptides hydrophobes par nature qui sont élués de la colonne ci-dessus mentionnées et dans les conditions ci-dessus précisées avec un temps de rétention correspondant à un pourcentage d'acétonitrile compris entre 12 % et 38 %. Le temps de rétention médian des peptides de la composition selon l'invention est de 26 min correspondant à un pourcentage d'acétonitrile de 25 % dans l'éluant.

Avantageusement selon l'invention, la composition de peptides est à l'état liquide. Il peut s'agir d'une solution de la composition de peptides selon l'invention dans un solvant liquide, notamment dans un solvant aqueux.

Avantageusement selon l'invention, la composition de

peptides est à l'état solide. La composition de peptides peut être sous la forme d'un solide à l'état divisé. Il peut s'agir en particulier d'un solide à l'état au moins partiellement déshydraté. La composition de peptides selon l'invention peut être sous forme d'une poudre.

Avantageusement selon l'invention, la composition de peptides est exempte d'hydrate de carbone.

Avantageusement selon l'invention, la composition de peptides est exempte de matière grasse.

Avantageusement selon l'invention, les peptides de la composition sont hydrosolubles. Avantageusement, les peptides de la composition de peptides sont solubles à 100% dans l'eau. Avantageusement, la composition de peptides est hydro-compatible.

Avantageusement selon l'invention, les peptides de la composition de peptides sont issus d'une hydrolyse enzymatique contrôlée de collagène de peau d'au moins un poisson choisi dans le groupe formé des poissons de la famille des *Pangasiidae* -notamment de *Pangasius hypophtalmus* (ou *Pangasianodon hypophtalmus*), de *Pagasius pangasius*, de *Pangasius bocourti*- et de la famille des *Cichlidae* -notamment du genre *Oreochromis*, en particulier d'*Oreochromis niloticus* ou du genre *Tilapia* -. Avantageusement, les peptides de la composition de peptides sont issus d'une hydrolyse enzymatique contrôlée de collagène de peau d'au moins un poisson vivant dans une eau d'une région tempérée.

L'invention s'étend également à l'utilisation d'une telle composition de peptides dans un traitement thérapeutique du corps humain ou animal. L'invention s'étend donc également à une telle composition de peptides pour son utilisation à titre de médicament. L'invention s'étend donc à une telle composition de peptides pour son utilisation à titre de médicament dans le traitement préventif ou curatif d'au moins une pathologie du corps humain ou animal.

L'invention s'étend également en particulier à une composition de peptides pour son utilisation comme médicament dans au moins

l'un des traitements suivants :

- traitement d'une pathologie digestive ;
- traitement d'une candidose intestinale ;
- traitement d'une inflammation digestive, et ;
- maintien du microbiote intestinal.

L'invention s'étend également à toute utilisation d'une composition de peptides selon l'invention en alimentation humaine. En particulier, avantageusement la composition selon l'invention est utilisée à titre de complément alimentaire.

L'invention s'étend également à une composition de peptide obtenue par un procédé dans lequel :

- on sélectionne des peaux de poissons de la famille des *Pangasiidae* et/ou de la famille des *Cichlidae*, puis ;
- on réalise successivement :

. au moins une étape de lavage des peaux, puis ;

. au moins une étape de traitement acide des peaux adapté pour permettre une extraction du collagène des peaux, puis ;

. au moins une étape d'hydrolyse du collagène par une protéase à cystéine d'origine végétale -en particulier au moins une protéase de *Carica papaïa*- à une température inférieure à 75°C, puis ;

. une interruption de l'hydrolyse enzymatique par chauffage de l'hydrolysat de collagène à une température supérieure à la température de dénaturation de la protéase à cystéine de façon à former la composition de peptides.

Dans un tel procédé, avantageusement et selon l'invention, on réalise une étape ultérieure de filtration de la composition de peptides. Avantageusement, on réalise également une étape de pasteurisation de la composition de peptides pendant une durée d'au moins 2 minutes à une température de pasteurisation comprise entre 85°C et 90°C minimum.

Dans un tel procédé, avantageusement et selon l'invention, on réalise une étape de séchage de la composition de peptides. On réalise cette

étape de séchage par atomisation de façon à former une composition selon l'invention sensiblement déshydratée et sous la forme d'une poudre.

L'invention s'étend donc à une composition de peptides obtenue par un procédé dans lequel :

- on sélectionne des peaux de poissons de la famille des *Pangasiidae* et/ou de la famille des *Cichlidae*, puis ;
- on réalise successivement :
  . au moins une étape de lavage des peaux, puis ;
  . au moins une étape de traitement acide des peaux adapté pour permettre une extraction du collagène des peaux, puis ;
  . au moins une étape d'hydrolyse du collagène par une protéase à cystéine d'origine végétale -en particulier au moins une protéase de *Carica papaïa*- à une température inférieure à 75°C, puis ;
  . une interruption de l'hydrolyse enzymatique par chauffage de l'hydrolysat de collagène à une température supérieure à la température de dénaturation de la protéase à cystéine de façon à former la composition de peptides ;

ladite composition de peptides présentant une analyse globale des acides aminés dans laquelle :

- la glycine est en quantité molaire telle que le rapport de cette quantité sur la somme des quantités molaires des acides aminés dans la composition est compris entre 20,0 % et 24,5 % ;
- l'hydroxyproline est en quantité molaire telle que le rapport de cette quantité sur la somme des quantités molaires des acides aminés dans la composition est compris entre 6,0 % et 12,0 % ;
- la proline est en quantité molaire telle que le rapport de cette quantité sur la somme des quantités molaires des acides aminés dans la composition est compris entre 10,6 % et 14,6 %;

la composition de peptides présentant, lors d'une analyse par chromatographie d'exclusion lors de laquelle chaque peptide de la composition de peptides est élué avec un temps de rétention représentatif du poids moléculaire apparent de ce

peptide, une courbe d'élution (c'est-à-dire une courbe ou un profil d'élution d'un chromatogramme) des peptides présentant une valeur d'aire sous la courbe (c'est-à-dire une valeur d'aire représentative de la quantité massique de peptides) correspondant aux peptides de poids moléculaire apparent inférieur à 1400 Da telle que le rapport de cette valeur d'aire sur l'aire totale sous la courbe (correspondant à l'ensemble des peptides de la composition) est inférieur à 40 % ;

ladite analyse étant réalisée comme décrit ci-après ;

- sur une colonne de filtration de dimensions 300 x 7,8 mm comprenant une phase stationnaire formée d'un gel de silice d'une porosité de 5 µm ;
- la colonne étant maintenue à la température de 40°C ;
- avec, à titre de phase mobile, une solution formée (A) d'eau ultra pure comprenant 0,1% en volume d'acide trifluoroacétique et (B) d'acétonitrile, dans laquelle le rapport volumique A/B est de 75/25 ;
- en introduisant en tête de la colonne de filtration sur gel un volume d'une solution comprenant de la composition de peptides ;
- le débit de la phase mobile dans la colonne étant de 0,6 mL/min, et ;
- les peptides de la composition étant détectés par absorbance à la longueur d'onde de 214 nm.

L'invention concerne également une composition de peptides, une telle composition de peptides pour son utilisation comme médicament, un procédé d'obtention d'une telle composition de peptides et une telle composition de peptides obtenue par un tel procédé d'obtention caractérisés en combinaison par tout ou partie des caractéristiques mentionnées ci-dessus ou ci-après.

D'autres buts, caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront à la lecture de la description suivante donnée à titre non limitatif et qui se réfère aux figures annexées, dans lesquelles :

- la figure 1 est un chromatogramme représentatif d'une analyse d'une composition de peptides selon l'invention par filtration sur gel ;
- la figure 2 est un chromatogramme représentatif d'un

analyse HPLC d'une composition de peptides selon l'invention sur une résine échangeuse d'anions ;

– la figure 3 est un chromatogramme représentatif d'un analyse d'une composition de peptides selon l'invention par chromatographie en phase inverse ;

– la figure 4 est une représentation graphique représentative de l'évolution de la masse corporelle de souris dont l'inflammation colique est induite par le dextran sulfate de sodium (DSS) ;

– la figure 5 est une représentation graphique en histogramme du résultat d'un dosage d'IL1β dans le colon de souris par la méthode ELISA ;

– la figure 6 est une représentation graphique en histogramme du résultat d'un dosage d'IL6 dans le colon de souris par la méthode ELISA ;

– la figure 7 est une représentation graphique en histogramme du résultat d'un dosage de TNF-α dans le colon de souris par la méthode ELISA ;

– la figure 8 est une représentation graphique en histogramme du résultat d'un dosage de TGF-β dans le colon de souris par la méthode ELISA ;

– la figure 9 est une représentation graphique en histogramme du résultat d'un dosage par PCR de la flore fongique dans le colon de souris ;

– la figure 10 est une représentation graphique en histogramme du résultat d'un dosage par PCR de *Saccharomyces cerevisiae* dans le colon de souris ;

– la figure 11 est une représentation graphique en histogramme du résultat d'un dosage par PCR des entérobactéries dans le colon de souris ;

– la figure 12 est une représentation graphique en

histogramme du résultat d'un dosage par PCR des firmicutes dans le colon de souris ;

– la figure 13 est une représentation graphique en histogramme du résultat d'un dosage par PCR des bacteroidetes dans le colon de souris ;

– la figure 14 est une représentation graphique en histogramme du résultat d'un dosage par PCR de *Faecalibacterium prausnitzii* dans le colon de souris ;

– la figure 15 est une représentation graphique en histogramme du résultat d'un dosage par PCR de *Lactobacille murinus* dans le colon de souris ;

– la figure 16 est une représentation graphique en histogramme d'une analyse par RT-PCR quantitative des ARN messagers du TGF-β dans le colon de souris ;

– la figure 17 est une représentation graphique en histogramme d'une analyse par RT-PCR quantitative des ARN messagers de la NO-synthase inductible (iNOS) dans le colon de souris, et ;

– la figure 18 est une représentation graphique en histogramme d'une analyse par RT-PCR quantitative des ARN messagers de Fizz1 dans le colon de souris ;

– la figure 19 est une représentation graphique en histogramme d'une analyse par RT-PCR quantitative des ARN messagers de la 5-LOX dans le colon de souris ;

– la figure 20 est une représentation graphique en histogramme d'une analyse par RT-PCR quantitative des ARN messagers de la 12/15-LOX dans le colon de souris.

<u>Procédé de préparation d'une composition selon l'invention</u>

On prélève ou on achète des peaux de poissons d'eaux de régions tempérées, notamment de poisson de la famille des *Pangasiidae* -notamment de *Pangasius hypophtalmus* (ou *Pangasianodon hypophtalmus*), de *Pagasius pangasius*, de *Pangasius bocourti*- et/ou de poisson-chat ou de la

famille des *Cichlidae* -notamment du genre *Oreochromis*, en particulier d'*Oreochromis niloticus* ou du genre *Tilapia*-.

On réalise une succession d'étapes de lavage de la peau, de traitement acide de la peau lavée et d'extraction et de purification du collagène. On réalise ensuite une étape d'hydrolyse enzymatique du collagène de peaux de poissons ainsi obtenu de façon à former la composition selon l'invention. Pour ce faire, on chauffe de l'eau à une température comprise entre 70°C et 75°C. On verse progressivement dans l'eau chaude et sous agitation une masse de collagène de peaux de poissons telle que la proportion de massique de collagène dans l'eau soit de 45%, et on ajuste le pH de la solution à pH 6,0. On ajoute ensuite à la solution de collagène refondu une quantité de protéase à cystéine d'origine végétale. On choisit à titre de protéase à cystéine au moins une protéase de *Carica papaïa*, notamment la lypaine (Lypaine®, LYVEN, Collombelles, France) à l'état sec. Le rapport de la masse de protéase à cystéine sur la masse de collagène est adapté selon les conditions d'hydrolyse souhaitées. Par exemple, Le rapport de la masse de protéase à cystéine sur la masse de collagène est de 0,2%. On maintient la température de la solution à une valeur comprise entre 65°C et 70°C adaptée pour favoriser l'activité enzymatique de la protéase à cystéine et pour maintenir la fluidité optimale de l'hydrolysat de collagène en tenant compte du fait que la viscosité de l'hydrolysat de collagène diminue avec le temps d'hydrolyse. On maintient la solution à cette température pendant une durée de l'ordre de 45 minutes.

On stoppe la réaction d'hydrolyse enzymatique par chauffage de l'hydrolysat de collagène à une température supérieure à la température de dénaturation de la protéase à cystéine, par exemple à une température comprise entre 85°C et 90°C pendant 20 minutes. L'hydrolysat de collagène de peaux de poisson est éventuellement soumis à une étape de filtration puis à une étape de pasteurisation pendant une durée d'au moins 2 minutes à une température de pasteurisation comprise entre 85°C et 90°C minimum.

L'hydrolysat de collagène ou peptides de collagène est ensuite soumis à une étape de séchage dans des conditions propres à former une

composition selon l'invention formée d'une poudre de granulométrie prédéterminée.

Caractérisations structurelles des peptides de la composition selon l'invention

Composition en acides aminés

On réalise une caractérisation de la composition de peptides selon l'invention par dosage des acides aminés libres et totaux au moyen d'un analyseur d'acides aminés ou au moyen d'un équipement de chromatographie liquide à haute performance (CLHP/HPLC) conformément à la norme ISO 13903:2005.

On réalise également une caractérisation d'une composition de peptides selon l'invention par la distribution des poids moléculaires apparents des peptides, par la polarité des peptides et pas l'hydrophobie des peptides.

Analyse des poids moléculaires apparents des peptides

On analyse la distribution en poids moléculaires apparent des peptides constitutifs d'une composition selon l'invention par perméation de gel sur une colonne de chromatographie liquide de dimensions 300 x 7,8 mm dans laquelle la phase stationnaire est constituée d'un gel à base de silice (BioSep-SEC-S2000, Phénomenex, Le Peck, France) d'une porosité de 5 µm. La colonne de filtration étant maintenue à une température de 40°C. La phase mobile est constituée d'un mélange comprenant (A) de l'eau ultra pure additionnée d'acide trifluoroacétique (0,1% en volume) et (B) de l'acétonitrile (A/B ; 75/25 ; v/v). Le débit de la phase mobile est maintenu à 0,6 mL/min. Le volume de la solution comprenant la composition de peptides à analyser est de 25 µL. La détection est réalisée en sortie de la colonne de perméation de gel par la mesure d'absorbance à la longueur d'onde de 214 nm. On réalise en parallèle une courbe d'étalonnage de détermination d'un poids moléculaire apparent en fonction du temps de rétention. Pour réaliser cette courbe d'étalonnage on choisit des peptides connus de poids moléculaire compris entre 100 Da et 30 kDa. Les étalons connus sont la proline, la glutathionne, la ribonucléase A et la trypsine, de poids moléculaires apparents respectifs de 115 Da, 307 Da, 13,7 kDa et 28,2 kDa.

Les poids moléculaires apparents et les temps de rétention exprimés en minutes des étalons sont donnés au tableau 1 ci-après :

Etalon	PM, Da	Temps de rétention, min
Proline	115	17.193
Glutathionne	307	16.938
Ribonucléase A	13700	10.275
Trypsine	28161	10.232

Tableau 1

Les peptides sont élués de la colonne successivement en fonction de leur poids moléculaire apparent décroissant. Les valeurs des temps de rétention de chaque famille de peptides de la composition à analyser correspondant à un pic du chromatogramme sont relevées au sommet de chaque pic du chromatogramme et traduites en valeur de poids moléculaire apparent par comparaison avec la courbe d'étalonnage. Les valeurs relatives des quantités de chaque famille de peptides correspondent à la valeur de l'air sous la courbe correspondant à chaque pic du chromatographe. Ces valeurs sont exprimées par le rapport de la valeur de l'aire sous la courbe correspondant à une famille de peptides sur la somme des valeurs des aires de chaque famille de peptides.

Les valeurs des temps de rétention (min), des poids moléculaires apparents correspondant (Da) et du pourcentage de l'aire sous la courbe (exprimée en pourcentage de l'aire totale sous la courbe) correspondant à chaque famille de peptides du chromatogramme représenté en figure 1 sont données au tableau 2 ci-après. On identifie chaque groupe de peptides correspondant à un pic du chromatogramme par la valeur du poids moléculaire apparent correspondant au maximum de ce pic du chromatogramme.

Temps de rétention (min)	Poids moléculaire apparent (Da)	Aire sous la courbe (%)
11,130	10869	6,6
11,560	8096	7,0
12,072	5703	9,6
12,430	4461	13,0
12,962	3100	13,6
13,678	1897	19,0
14,638	983	21,6
16,217	333	9,6

Tableau 2

La proportion de peptides de la composition selon l'invention -dont le chromatogramme est représenté en figure 1 et dont les valeurs sont données au tableau 2- dont le poids moléculaire apparent est inférieur à 1400 Da est de 31,2 % (poids moléculaires apparents de valeurs 983 Da et 333 Da) par rapport à l'ensemble des peptides de la composition.

Le poids moléculaire apparent moyen des peptides de la composition selon l'invention dont les valeurs de poids moléculaire apparent sont données au tableau 2 est de 3442 Da. On définit le poids moléculaire apparent moyen des peptides de la composition comme la moyenne des valeurs de poids moléculaires apparents pondérés correspondant à chaque groupe de peptides de la composition correspondant à un même pic du chromatogramme. La valeur du poids moléculaire apparent pondéré d'un groupe de peptides d'un même pic du chromatogramme correspond à la valeur du poids moléculaire apparent au sommet (maximum) du pic pondérée par le rapport de la valeur de l'aire sous la courbe du pic correspondant sur l'aire (totale) sous la courbe du chromatogramme. On entend par « aire sous la courbe » ou « aire sous le pic », l'aire de la surface s'étendant entre la courbe décrivant le pic du chromatogramme et la ligne de base du chromatogramme. En particulier, l'aire sous l'un des pics du chromatogramme s'étend entre deux minima de la courbe

du chromatogramme encadrant un sommet (ou maximum) de la courbe du chromatogramme.

À titre de la généralisation, sont présentées au tableau 3 ci-après, les valeurs moyennes des temps de rétention (min), des poids moléculaires apparents correspondant (Da) et du pourcentage de l'aire sous la courbe de chaque famille de peptides correspondant à des analyses distinctes de trois compositions de peptides selon l'invention.

Temps de rétention (min)	Poids moléculaire (Da)	Aire (%)
11,13 ± 0,15	10870 ± 830	4,6 ± 2
11,50 ± 0,20	8596 ± 700	5,6 ± 2
11,7 ± 0,1	7180 ± 100	4,5 ± 1
12,27 ± 0,3	5703 ± 400	9,6 ± 2
12,45 ± 0,20	4430 ± 100	13,0 ± 1
13,00 ± 0,06	3100 ± 100	13,5 ± 1
13,67 ± 0,06	1870 ± 40	20,0 ± 1
14,64 ± 0,02	983 ± 20	22,5 ± 2
16,18 ± 0,04	340 ± 10	12,0 ± 2,5
16,79 ± 0,01	224 ± 5	0,7 ± 0,15

Tableau 3

La proportion moyenne de peptides de compositions selon l'invention -dont les valeurs sont données au tableau 3- et dont le poids moléculaire est inférieur à 1400 Da est de 35,2 % (correspondants essentiellement aux poids moléculaires apparents de 983 Da et de 340 Da).

Analyse de la polarité des peptides constitutifs

On analyse la proportion de peptides anioniques dans la composition selon l'invention dont la distribution des poids moléculaires apparents est donnée au tableau 2, c'est-à-dire la proportion de peptides présentant une charge négative à pH 8,35. On analyse également la proportion de peptides neutres et/ou cationiques dans la composition selon l'invention, c'est-à-dire la proportion de peptides présentant une charge globalement neutre à pH 8,35 ou présentant une charge positive à pH 8,35. On réalise une telle analyse par

chromatographie liquide haute performance (HPLC) d'échange d'ions dans laquelle la phase stationnaire est une résine échange d'anions (Hydrophase HP-SAX, Interchim, Montluçon, France) de granulométrie 10 µm. La colonne de chromatographie HPLC d'échange d'ions est de dimensions 100 x 7,8 mm.

On conditionne la colonne de chromatographique HPLC par échange d'ions dans un tampon tris(hydroxyméthyl)aminométhane) (Tris) à une concentration de 5 mM dans l'eau et dont le pH est ajusté à la valeur de 8,35. La température de la colonne est maintenue une température de 25°C. Le débit de la phase mobile dans la colonne et de 1 mL/min. On prépare un échantillon de la composition de peptides à analyser de sorte que sa concentration soit de 2 g/L par dilution dans l'eau ultrapure. On introduit en tête de colonne un volume de 90 µL de cette solution à analyser. La détection est réalisée par mesure de l'absorbance en continu à 214 nm.

À compter de l'introduction de l'échantillon en tête de la colonne, la phase mobile est constituée de Tris 5 mM à pH 8,35 (solution A) pendant une durée de 7 minutes, puis d'une phase mobile dans laquelle une solution B formée de Tris 5mM, NaCℓ 5 M, pH 8,35 augmente linéairement de 0 % à 100 % dans la solution A en 30 minutes. On maintient ensuite l'élution par la solution B pendant 2 minutes.

Le chromatogramme obtenu est représenté en figure 2. Les peptides anioniques sortent de la colonne avec un temps de rétention compris entre 10 min et 17,5 min correspondants à une concentration en NaCℓ comprise entre 0,5 M et 1,7 M. La proportion de peptides anioniques dans la composition de peptides selon l'invention dont l'analyse représentée en figure 2 est de 36,9 %. Les peptides neutres et cationiques sortent de la colonne avec un temps de rétention comprise entre 1 minute et 8 minutes. La proportion de peptides neutres et cationiques dans la composition de peptides selon l'invention dans l'analyse représentée en figure 2 est de 57,5 %.

À titre de la généralisation, on reproduit cette analyse sur trois compositions de peptides selon l'invention. La proportion moyenne de peptides anioniques dans ces compositions selon l'invention est comprise entre

27,9 % et 42,5 % et la proportion moyenne de peptides neutres et cationiques dans ces compositions selon l'invention est comprise entre 57,5 % et 72,1 %.

Analyse de l'hydrophobie des peptides constitutifs

On analyse l'hydrophobie des peptides constitutifs de la composition selon l'invention par chromatographie liquide en phase inverse sur une colonne de silice greffée par des groupements butyle (Vydac 214TP™ C_4, Grace, Epernon, France) de dimensions 250 x 4,6 mm. La granulométrie de la silice est de 5 µm et sa porosité est de 300 Å.

On conditionne la colonne dans l'eau ultrapure acidifiée avec 0,1 % d'acide trifluoroacétique. La température de la colonne est maintenue une température de 40°C. Le débit de la phase mobile dans la colonne et de 0,6 mL/min. On prépare un échantillon de la composition de peptides à analyser de sorte que sa concentration soit de 2 g/L par dilution dans l'eau ultrapure. On introduit en tête de colonne un volume de 100 µL de cette solution à analyser. La détection est réalisée par mesure de l'absorbance en continu à la longueur d'onde de 214 nm.

À compter de l'introduction de l'échantillon en tête de la colonne, la phase mobile est constituée d'eau acidifiée (solution A) pendant une durée de 7 minutes, puis d'une phase mobile dans laquelle une solution B formée d'eau acidifiée avec 0,1% (en volume) d'acide trifluoroacétique et comprenant 40% d'acétonitrile augmente linéairement de 0 % à 100 % dans la solution A en 30 minutes.

Le chromatogramme obtenu est représenté en figure 3. Les peptides de la composition selon l'invention sortent de la colonne avec un temps de rétention compris entre 16 min et 36 min correspondants à un pourcentage d'acétonitrile compris entre 12 % et 38 % dans l'éluant. Le temps de rétention médian des peptides de la composition selon l'invention est de 26 min correspondant à un pourcentage d'acétonitrile de 25 % dans l'éluant.

Effets biologiques d'une composition selon l'invention

Effet sur la colonisation par *Candida albicans* et sur la candidose digestive

On analyse l'effet d'une composition selon l'invention sur la candidose digestive induite chez des souris femelles C57BL/6, âgées de 8 semaines et d'un poids compris entre 20-25g. On nourrit ces souris pendant une durée de 21 jours avec la composition selon l'invention à raison de 4 g/Kg/jour. Au 21ème jour, on induit la candidose digestive par gavage de chaque souris avec une quantité de 5.10^7 cellules de levure. Entre 2 jours (J2) et 7 jours (J7) après induction, on collecte les selles des souris et on évalue la charge en levure (CFU/mg de selles) sur un milieu chromogène. Les résultats sont donnés au tableau 4 ci-après. Les valeurs « Contrôle » correspondant aux valeurs mesurée sur des souris dont la candidose digestive est induite mais non traitées avec la composition selon l'invention.

Jour après induction	Composition selon l'invention	CFU/mg selle
J3	Oui	125
J3	Non	263
J4	Oui	125
J4	Non	275
J5	Oui	150
J5	Non	250

Tableau 4

On observe une diminution de la charge de *Candida albicans* induite par la composition selon l'invention.

Inflammation colique

L'effet anti-inflammatoire de la composition de peptides selon l'invention est démontré sur un modèle murin d'inflammation pharmacologique induit par le dextran sulfate de sodium (DSS, MP Biomedical LLC, Canada) caractérisée par une perte de poids et des diarrhées sanglantes.

On étudie l'effet de la composition de peptides selon l'invention pour limiter la perte de poids de souris traitées au DSS. On traite pendant 7 jours (J_1 à J_7) des souris de laboratoire C57BL/6 femelles âgées de 10 à 11 semaines et de masse comprise entre 20 et 25 grammes, avec du DSS dissout à raison de 1,5% (poids/volume) dans l'eau de boisson des souris. On traite

également pendant 12 jours (J_1 à J_{12}) ces souris avec la composition selon l'invention à raison de 0,1 g/Kg/jour ; 1 g/Kg/jour et 4 g/Kg/jour. On délivre cette quantité de composition selon l'invention dans l'eau de boisson des souris. À J_{12}, les souris sont euthanasiées.

On prépare 5 lots de souris, chaque lot comprenant 10 souris, dont :

- le lot 1 est traité par le DSS pendant 7 jours ;
- le lot 2 est traité par le DSS pendant 7 jours et avec la composition selon l'invention à raison de 0,1 g/Kg/jour pendant 12 jours ;
- le lot 3 est traité par le DSS pendant 7 jours et avec la composition selon l'invention à raison de 1 g/Kg/jour pendant 12 jours ;
- le lot 4 est traité par le DSS pendant 7 jours et avec la composition selon l'invention à raison de 4 g/Kg/jour pendant 12 jours ;
- le lot 5 est traité par le DSS pendant 7 jours et avec de la caséine hydrolysée non conforme à l'invention à raison de 0,1 g/Kg/jour pendant 12 jours.

On réalise en parallèle un contrôle sur 5 souris qui ne sont pas traitées par le DSS et pour lesquelles l'inflammation n'est pas induite, et qui ne sont pas traitées avec une composition de peptide selon l'invention.

1. <u>Étude du poids corporel</u>

On mesure chaque jour le poids de chaque souris et on calcule la perte de poids subie par chaque souris de chaque lot. Les résultats sont présentés en figure 4, dans laquelle le contrôle est représenté par des cercles ouverts (○), le lot 1 est représenté par des cercles pleins (●), le lot 2 est représenté par des carrés ouverts (□), le lot 3 est représenté par des carrés pleins (■), le lot 4 est représenté par des triangles ouverts (Δ) et le lot 5 est représené par des triangles pleins (▲). On observe que dès 0,1g/Kg/jour (lot 2, □), la composition selon l'invention limite la perte de poids des souris. Cette limitation est également observée pour 1 g/Kg/jour (lot 3, ■) et pour 4 g/Kg/jour (lot 4, Δ). Elle n'est pas observée pour le traitement avec la caséine hydrolysée (lot 5, ▲)

pour lequel la perte de poids est comparable à la perte de poids des souris du lot 1 (●).

La composition selon l'invention permet de limiter, voire d'annuler quasiment intégralement, la perte de poids engendrée par l'inflammation induite par le dextran sulfate de sodium (DSS) chez la souris. La composition selon l'invention est susceptible de pouvoir être utilisée à titre de médicament, notamment pour le traitement de l'inflammation colique.

2. Histologie

Les coupes histologiques transversales de colon de souris traitées par le DSS seul présentent après coloration bichromatique par l'hématoxyline et l'éosine d'importantes infiltrations de cellules inflammatoires au niveau de la muqueuse et de la sous muqueuse. L'épaisseur de l'épithélium est réduite. L'épithélium présente des ulcérations étendues. Les coupes histologiques transversales de colon de souris traitées par le DSS et par la composition selon l'invention à raison de 0,1 g/Kg/jour, 1 g/Kg/jour et 4 g/Kg/jour présentent après coloration bichromatique par l'hématoxyline et l'éosine des glandes tubulaires serrées et rectilignes représentatives d'un épithélium sain et fonctionnel.

3. Score macroscopique

On calcule pour chaque condition de traitement un score macroscopique à partir de notations établies selon l'échelle de Wallace relatives à l'aspect des selles, à l'aspect endommagé du colon, au poids du colon et à la longueur du colon, selon l'échelle de Wallace (E. S. Kimball, N. H. Wallace, C. R. Scnneider, M. R. D'Andrea et P. J. Hornby; 2004 ; Neurogastroenterol Motil ; *16*, 811–818. Vanilloid receptor 1 antagonists attenuate disease severity in dextran sulphate sodium-induced colitis in mice). La valeur du score macroscopique est d'autant plus élevée que le colon est inflammatoire et est d'autant plus faible que le colon est sain.

Les valeurs moyennes et l'écart-type du score macroscopique des souris des lots 1 à 5 sont données au tableau 5 ci-après.

	Score macroscopique moyen	Écart-type	
Lot 1	5,14	0,46	
Lot 2 (0,1 g/Kg/jour)	1,30	0,33	p<0,01
Lot 3 (1 g/Kg/jour)	1,90	0,5	p<0,01
Lot 4 (4 g/Kg/jour)	3,00	0,33	p<0,01
Lot 5	5,00	0,61	

Tableau 5

Il est observé une diminution du score macroscopique induit par le traitement avec la composition selon l'invention, c'est-à-dire une amélioration de l'état inflammatoire du colon induite par la composition selon l'invention.

4. Inhibition de l'expression de marqueurs pro-inflammatoires chez la souris

À J_{12}, on euthanasie les souris et on dose le niveau d'expression au niveau du colon de cytokines pro-inflammatoires par la technique d'ELISA :

- IL-1β : Le taux d'IL-1β est analysé par la technique ELISA et exprimé en picogramme (pg) d'IL-1β par milligramme (mg) de colon. Les résultats sont représentés en figure 5 dans laquelle la première colonne (colonne blanche) correspond à l'analyse effectuée sur les souris du contrôle. La deuxième colonne (colonne à hachures obliques) correspond à l'analyse effectuée sur les souris du lot 1. La troisième colonne (colonne à hachures verticales) correspond à l'analyse effectuée sur les souris du lot 4. La quatrième colonne (colonne à hachures horizontales) correspond à l'analyse effectuée sur les souris du lot 3. La cinquième colonne (colonne grisée) correspond à l'analyse effectuée sur les souris du lot 2. La sixième colonne (colonne pleine noire) correspond à l'analyse effectuée sur les souris du lot 5. On observe une diminution statistiquement significative ($p<0,05$) de l'expression d' IL 1-β dans le colon de souris traitées avec la composition de peptides selon l'invention pour des doses de 0,1g/Kg/jour, 1g/Kg/jour et 4g/Kg/jour par rapport au colon de souris dont l'inflammation est induite par le DSS et par rapport aux

souris dont l'inflammation est induite par le DSS et traitée avec la caséine hydrolysée. Cet effet a été confirmé par analyse des ARN messagers de IL-1β par RT-PCR quantitative en particulier ($p<0,01$) pour les doses de 0,1g/Kg/jour et 1g/Kg/jour ;

- IL6 : Le taux d'IL6 est analysé par la technique ELISA et exprimé en picogramme (pg) d'IL6 par milligramme (mg) de colon. Les résultats sont représentés en figure 6 dans laquelle la première colonne (colonne blanche) correspond à l'analyse effectuée sur les souris du contrôle. La deuxième colonne (colonne à hachures obliques) correspond à l'analyse effectuée sur les souris du lot 1. La troisième colonne (colonne à hachures verticales) correspond à l'analyse effectuée sur les souris du lot 4. La quatrième colonne (colonne à hachures horizontales) correspond à l'analyse effectuée sur les souris du lot 3. La cinquième colonne (colonne grisée) correspond à l'analyse effectuée sur les souris du lot 2. La sixième colonne (colonne pleine noire) correspond à l'analyse effectuée sur les souris du lot 5. On observe une diminution statistiquement significative de l'expression d'IL6 dans le colon de souris traitées avec la composition de peptides selon l'invention pour des doses de 0,1g/Kg/jour ($p<0,01$), 1g/Kg/jour ($p<0,01$) et 4g/Kg/jour ($p<0,05$) par rapport au colon de souris dont l'inflammation est induite par le DSS et par rapport aux souris dont l'inflammation est induite par le DSS et traitée avec la caséine hydrolysée. Cet effet a été confirmé par analyse des ARN messagers de IL6 par RT-PCR quantitative ;

- TNF-α : Le taux de TNF-α est analysé par la technique ELISA et exprimé en picogramme (pg) de TNF-α par milligramme (mg) de colon. Les résultats sont représentés en figure 7 dans laquelle la première colonne (colonne blanche) correspond à l'analyse effectuée sur les souris du contrôle. La deuxième colonne (colonne à hachures obliques) correspond à l'analyse effectuée sur les souris du lot 1. La troisième colonne (colonne à hachures verticales) correspond à l'analyse effectuée sur les souris du lot 4. La quatrième colonne (colonne à hachures horizontales) correspond à l'analyse effectuée sur les souris du lot 3. La cinquième colonne (colonne grisée)

correspond à l'analyse effectuée sur les souris du lot 2. La sixième colonne (colonne pleine noire) correspond à l'analyse effectuée sur les souris du lot 5. On observe une diminution statistiquement significative de l'expression du TNF-α dans le colon de souris traitées avec la composition de peptides selon l'invention pour des doses de 0,1g/Kg/jour ($p<0,05$), 1g/Kg/jour ($p<0,05$) et 4g/Kg/jour ($p<0,05$) par rapport au colon de souris dont l'inflammation est induite par le DSS et par rapport aux souris dont l'inflammation est induite par le DSS et traitée avec la caséine hydrolysée.

L'analyse par RT-PCR (« *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* ») quantitative des ARN messagers de MCP1 montre une diminution statistiquement significative de ces ARNm induits par le DSS, en particulier pour les doses de 0,1 g/Kg/jour ($p<0,01$) et 1 g/Kg/jour ($p<0,05$) de composition de peptides selon l'invention.

L'analyse par RT-PCR (« *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* ») quantitative des ARN messagers de la NO-synthase inductible (iNOS) est représentée en figure 17 dans laquelle la première colonne (colonne blanche) correspond à l'analyse effectuée sur les souris du contrôle. La deuxième colonne (colonne à hachures obliques) correspond à l'analyse effectuée sur les souris du lot 1. La troisième colonne (colonne à hachures verticales) correspond à l'analyse effectuée sur les souris du lot 4. La quatrième colonne (colonne à hachures horizontales) correspond à l'analyse effectuée sur les souris du lot 3. La cinquième colonne (colonne grisée) correspond à l'analyse effectuée sur les souris du lot 2. La sixième colonne (colonne pleine noire) correspond à l'analyse effectuée sur les souris du lot 5. Il a été observé une diminution statistiquement significative des ARNm de iNOS induits par le DSS pour les doses de 0,1 g/Kg/jour ($p<0,05$) et 1 g/Kg/jour ($p<0,05$) de la composition de peptides selon l'invention.

5. <u>Stimulation de l'expression de marqueurs anti-inflammatoires chez la souris</u>

À J_{12}, on euthanasie les souris et on analyse le niveau d'expression au niveau du colon de marqueurs anti-inflammatoires :

- TGF-β. Le taux de TGF-β est analysé par la technique ELISA et exprimé en picogramme (pg) de TGF-β par milligramme (mg) de colon. Les résultats sont représentés en figure 8 dans laquelle la première colonne (colonne blanche) correspond à l'analyse effectuée sur les souris du contrôle. La deuxième colonne (colonne à hachures obliques) correspond à l'analyse effectuée sur les souris du lot 1. La troisième colonne (colonne à hachures verticales) correspond à l'analyse effectuée sur les souris du lot 4. La quatrième colonne (colonne à hachures horizontales) correspond à l'analyse effectuée sur les souris du lot 3. La cinquième colonne (colonne grisée) correspond à l'analyse effectuée sur les souris du lot 2. La sixième colonne (colonne pleine noire) correspond à l'analyse effectuée sur les souris du lot 5. On observe une stimulation de l'expression du TGF-β dans le colon de souris traitées avec la composition de peptides selon l'invention pour la dose de 0,1g/Kg/jour par rapport au colon de souris dont l'inflammation est induite par le DSS. Cet effet a été confirmé par analyse des ARN messagers de TGF-β par RT-PCR quantitative, en particulier pour les doses de 0,1 g/Kg/jour et 1 g/Kg/jour de composition de peptides selon l'invention (figure 16) ;

- Fizz1 : Fizz1 est un marqueur des macrophages M2 anti-inflammatoires. L'analyse par RT-PCR (« *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* ») quantitative des ARN messagers de Fizz1 est représentée en figure 18 dans laquelle la première colonne (colonne blanche) correspond à l'analyse effectuée sur les souris du contrôle. La deuxième colonne (colonne à hachures obliques) correspond à l'analyse effectuée sur les souris du lot 1. La troisième colonne (colonne à hachures verticales) correspond à l'analyse effectuée sur les souris du lot 4. La quatrième colonne (colonne à hachures horizontales) correspond à l'analyse effectuée sur les souris du lot 3. La cinquième colonne (colonne grisée) correspond à l'analyse effectuée sur les souris du lot 2. La sixième colonne (colonne pleine noire) correspond à l'analyse effectuée sur les souris du lot 5. Il a été observé une augmentation statistiquement significative des ARN messagers de Fizz1 diminués par le DSS,

pour les doses de 0,1 g/Kg/jour ($p<0,05$), 1 g/Kg/jour ($p<0,01$) et 4 g/Kg/jour ($p<0,05$) de composition de peptides selon l'invention ;

- il a été également observé une augmentation statistiquement significative des ARN messagers de Ym1 diminués par le DSS, pour les doses de 1 g/Kg/jour ($p<0,05$) de composition de peptides selon l'invention.

6. Effet de la composition de peptides selon l'invention sur la flore colique – microbiote du colon

À J_{12}, on euthanasie les souris et on quantifie par PCR (« *Polymerase Chain Reaction* ») la flore colique de ces souris. Les valeurs sont normalisées par rapport à la quantité totale de bactéries ou de champignons et par rapport à la β–actine. La β–actine constitue le gène de référence permettant une normalisation par rapport à la quantité de tissu colique analysé. On quantifie en particulier :

- la flore fongique totale par l'amplification quantitative de l'ADN ribosomique fongique ITS1-2. Le rapport R de la quantité d'ADN ribosomique fongique ITS1-2 sur la quantité d'ADN de la β–actine est représenté en figure 9 dans laquelle la première colonne (colonne blanche) correspond au dosage effectué sur les souris du contrôle. La deuxième colonne (colonne à hachures obliques) correspond au dosage effectué sur les souris du lot 1. La troisième colonne (colonne à hachures verticales) correspond au dosage effectué sur les souris du lot 4. La quatrième colonne (colonne à hachures horizontales) correspond au dosage effectué sur les souris du lot 3. La cinquième colonne (colonne grisée) correspond au dosage effectué sur les souris du lot 2. La sixième colonne (colonne pleine noire) correspond au dosage effectué sur les souris du lot 5. La composition de peptides selon l'invention restore la flore fongique en particulier à la dose de 4g/Kg/jour ;

- la levure *Saccharomyces cerevisiae* par l'amplification quantitative de l'ADN ribosomique 26S. Le rapport R de la quantité d'ADN ribosomique 26S sur la quantité d'ADN de la β–actine est représenté en figure 10. La première colonne (colonne blanche) correspond au

dosage effectué sur les souris du contrôle. La deuxième colonne (colonne à hachures obliques) correspond au dosage effectué sur les souris du lot 1. La troisième colonne (colonne à hachures verticales) correspond au dosage effectué sur les souris du lot 4. La quatrième colonne (colonne à hachures horizontales) correspond au dosage effectué sur les souris du lot 3. La cinquième colonne (colonne grisée) correspond au dosage effectué sur les souris du lot 2. La sixième colonne (colonne pleine noire) correspond au dosage effectué sur les souris du lot 5. La composition de peptides selon l'invention restore de façon statistiquement significative la flore *Saccharomyces cerevisiae* aux doses de 0,1 g/Kg/jour ($p<0,05$), 1g/Kg/jour ($p<0,05$) et 4g/Kg/jour ($p<0,05$). En l'espèce, *S. cerevisiae* présente un potentiel anti-inflammatoire ;

- la flore d'entérobactéries par l'amplification quantitative de l'ADN ribosomique 16S. Le rapport R de la quantité d'ADN ribosomique 16S sur la quantité d'ADN de la β–actine est représenté en figure 11. La première colonne (colonne blanche) correspond au dosage effectué sur les souris du contrôle. La deuxième colonne (colonne à hachures obliques) correspond au dosage effectué sur les souris du lot 1. La troisième colonne (colonne grisée) correspond au dosage effectué sur les souris du lot 2. La quatrième colonne (colonne pleine noire) correspond au dosage effectué sur les souris du lot 5. La composition de peptides selon l'invention permet la diminution de la flore d'entérobactéries induite par le DSS à la concentration de 0,1 g/Kg/jour. Les entérobactéries sont associées à un potentiel pro-inflammatoire ;

- la flore de firmicutes par l'amplification quantitative de l'ADN ribosomique 16S sur un fragment du gène permettant l'analyse de la diversité dans le phylum. Le rapport R de la quantité d'un tel ADN ribosomique 16S sur la quantité d'ADN de la β–actine est représenté en figure 12. La première colonne (colonne blanche) correspond au dosage effectué sur les souris du contrôle. La deuxième colonne (colonne à hachures obliques) correspond au dosage effectué sur les souris du lot 1. La troisième colonne (colonne à hachures verticales) correspond au dosage effectué sur les souris du

lot 4. La quatrième colonne (colonne à hachures horizontales) correspond au dosage effectué sur les souris du lot 3. La cinquième colonne (colonne grisée) correspond au dosage effectué sur les souris du lot 2. La sixième colonne (colonne pleine noire) correspond au dosage effectué sur les souris du lot 5. La composition de peptides selon l'invention induit la diminution statistiquement significative de la flore de firmicutes induite par le DSS aux concentrations de 0,1 g/Kg/jour ($p<0,05$), 1g/Kg/jour ($p<0,05$) et 4 g/Kg/jour ($p<0,05$) mais aussi induit la diminution de la flore de firmicutes non induite à ces mêmes concentrations. Il est à noter que l'augmentation de la flore de firmicutes est généralement observée de façon connue au cours de l'inflammation digestive (« *IBD, Inflammatory Bowel Diseases* ») ;

- la flore de bacteroidetes par l'amplification quantitative de l'ADN ribosomique 16S sur un fragment du gène permettant l'analyse de la diversité dans le phylum. Le rapport R de la quantité d'un tel ADN ribosomique 16S sur la quantité d'ADN de la β–actine est représenté en figure 13. La première colonne (colonne à hachures obliques) correspond au dosage effectué sur les souris du lot 1. La deuxième colonne (colonne à hachures verticales) correspond au dosage effectué sur les souris du lot 4. La troisième colonne (colonne à hachures horizontales) correspond au dosage effectué sur les souris du lot 3. La quatrième colonne (colonne grisée) correspond au dosage effectué sur les souris du lot 2. La cinquième colonne (colonne pleine noire) correspond au dosage effectué sur les souris du lot 5. La composition de peptides selon l'invention induit la diminution statistiquement significative de la flore bacteroidetes induite par le DSS aux concentrations de 0,1 g/Kg/jour ($p<0,05$), 1g/Kg/jour ($p<0,05$) et 4 g/Kg/jour ($p<0,05$). L'augmentation des bacteroidetes est généralement observée de façon connue au cours de l'inflammation digestive (« *IBD* ») ;

- la flore de *Faecalibacterium praustnizii* par l'amplification quantitative d'ADN spécifique. Le rapport R de la quantité d'un tel ADN spécifique sur la quantité d'ADN de la β–actine est représenté en figure 14. La première colonne (colonne blanche) correspond au dosage effectué sur les

souris du contrôle. La deuxième colonne (colonne à hachures obliques) correspond au dosage effectué sur les souris du lot 1. La troisième colonne (colonne à hachures verticales) correspond au dosage effectué sur les souris du lot 4. La quatrième colonne (colonne à hachures horizontales) correspond au dosage effectué sur les souris du lot 3. La cinquième colonne (colonne grisée) correspond au dosage effectué sur les souris du lot 2. La sixième colonne (colonne pleine noire) correspond au dosage effectué sur les souris du lot 5. La composition de peptides selon l'invention induit l'augmentation statistiquement significative de la flore de *Faecalibacterium praustnizii* détruite par le DSS à la concentration de 0,1 g/Kg/jour ($p<0,01$), 1 g/Kg/jour ($p<0,01$) et 4 g/Kg/jour ($p<0,01$). L'augmentation de *Faecalibacterium praustnizii* est généralement observée de façon connue au cours de l'inflammation digestive (« *IBD* »). *Faecalibacterium praustnizii* aurait également des propriétés anti-inflammatoires ;

- la flore de *Lactobacillus murinus* par l'amplification quantitative d'un ADN spécifique. Le rapport R de la quantité d'un tel ADN spécifique sur la quantité d'ADN de la β–actine est représenté en figure 15 dans laquelle la première colonne (colonne blanche) correspond au dosage effectué sur les souris du contrôle. La deuxième colonne (colonne à hachures obliques) correspond au dosage effectué sur les souris du lot 1. La troisième colonne (colonne à hachures verticales) correspond au dosage effectué sur les souris du lot 4. La quatrième colonne (colonne à hachures horizontales) correspond au dosage effectué sur les souris du lot 3. La cinquième colonne (colonne grisée) correspond au dosage effectué sur les souris du lot 2. La sixième colonne (colonne pleine noire) correspond au dosage effectué sur les souris du lot 5. La composition de peptides selon l'invention induit l'augmentation de la flore de *Lactobacillus murinus* aux concentrations de 0,1 g/Kg/jour, 1 g/Kg/jour et 4 g/Kg/jour ($p<0,05$). *Lactobacillus murinus* aurait également des propriétés anti-inflammatoires.

7. <u>Effet de la composition de peptides selon l'invention sur les enzymes du métabolisme lipidique de l'acide arachidonique :</u>

- 5-LOX : L'analyse par RT-PCR (« *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* ») quantitative des ARN messagers de l'enzyme 5-lipoxygenase (5-LOX) est représentée en figure 19 dans laquelle la première colonne (colonne blanche) correspond à l'analyse effectuée sur les souris du contrôle. La deuxième colonne (colonne à hachures obliques) correspond à l'analyse effectuée sur les souris du lot 1. La troisième colonne (colonne à hachures verticales) correspond à l'analyse effectuée sur les souris du lot 4. La quatrième colonne (colonne à hachures horizontales) correspond à l'analyse effectuée sur les souris du lot 3. La cinquième colonne (colonne grisée) correspond à l'analyse effectuée sur les souris du lot 2. La sixième colonne (colonne pleine noire) correspond à l'analyse effectuée sur les souris du lot 5. Il a été observé une diminution statistiquement significative de l'expression de la 5-LOX pour des doses de la composition de peptides selon l'invention de 0,1 g/Kg/jour ($p<0,01$) et 1 g/Kg/jour ($p<0,01$) par rapport au contrôle non induit par le DSS. La composition de peptides selon l'invention présente un effet inhibiteur de l'expression de la 5-LOX favorisant la production de médiateurs lipidiques pro-inflammatoires ;

- 12/15-LOX : L'analyse par RT-PCR (« *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction* ») quantitative des ARN messagers de l'enzyme 12/15-lipoxygenase (12/15-LOX) est représentée en figure 20 dans laquelle la première colonne (colonne blanche) correspond à l'analyse effectuée sur les souris du contrôle. La deuxième colonne (colonne à hachures obliques) correspond à l'analyse effectuée sur les souris du lot 1. La troisième colonne (colonne à hachures verticales) correspond à l'analyse effectuée sur les souris du lot 4. La quatrième colonne (colonne à hachures horizontales) correspond à l'analyse effectuée sur les souris du lot 3. La cinquième colonne (colonne grisée) correspond à l'analyse effectuée sur les souris du lot 2. La sixième colonne (colonne pleine noire) correspond à l'analyse effectuée sur les souris du lot 5. Il a été observé une augmentation statistiquement significative de l'expression de la 12/15-LOX pour des doses de la composition de peptides selon l'invention de 0,1

g/Kg/jour ($p<0,01$) et 1 g/Kg/jour ($p<0,01$) par rapport au contrôle induit par le DSS.

Il va de soi que l'invention peut faire l'objet de nombreuses variantes de réalisation et d'applications. En particulier, différentes utilisations à titre de médicament peuvent varier sans sortir de la portée de protection de l'invention.

REVENDICATIONS

1/- Composition de peptides présentant un aminogramme dans lequel :

- la glycine est en quantité molaire telle que le rapport de cette quantité sur la somme des quantités molaires des acides aminés dans la composition est compris entre 20,0 % et 24,5 % ;

- l'hydroxyproline est en quantité molaire telle que le rapport de cette quantité sur la somme des quantités molaires des acides aminés dans la composition est compris entre 6,0 % et 12,0 % ;

- la proline est en quantité molaire telle que le rapport de cette quantité sur la somme des quantités molaires des acides aminés dans la composition est compris entre 10,6 % et 14,6 % ;

la composition de peptides présentant, lors d'une analyse par chromatographie d'exclusion lors de laquelle chaque peptide de la composition de peptides est élué avec un temps de rétention représentatif du poids moléculaire apparent de ce peptide, une courbe d'élution des peptides présentant une valeur d'aire sous la courbe correspondant aux peptides de poids moléculaire apparent inférieur à 1400 Da telle que le rapport de cette valeur d'aire sur l'aire totale sous la courbe est inférieur à 40 % ;

ladite analyse étant réalisée comme décrit ci-après ;

- sur une colonne de filtration de dimensions 300 x 7,8 mm comprenant une phase stationnaire formée d'un gel de silice d'une porosité de 5 µm ;
- la colonne étant maintenue à la température de 40°C ;
- avec, à titre de phase mobile, une solution formée (A) d'eau ultra pure comprenant 0,1% en volume d'acide trifluoroacétique et (B) d'acétonitrile, dans laquelle le rapport volumique A/B est de 75/25 ;
- en introduisant en tête de la colonne de filtration sur gel un volume d'une solution comprenant de la composition de peptides ;
- le débit de la phase mobile dans la colonne étant de 0,6 mL/min, et ;
- les peptides de la composition étant détectés par absorbance à la longueur d'onde de 214 nm.

2/- Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que chaque peptide de la composition présente un poids moléculaire apparent compris entre 200 Da et 12 000 Da.

3/- Composition selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que les peptides présentent une valeur de poids moléculaire apparent moyen comprise entre 2 500 Da et 3 600 Da.

4/- Composition selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle présente par analyse chromatographique sur une colonne échangeuse d'anions lors de laquelle chaque peptide de la composition de peptides est élué de la colonne avec un temps de rétention représentatif de sa charge :

- une valeur d'aire sous un pic correspondant aux peptides anioniques ;
- une valeur d'aire sous un pic correspondant aux peptides neutres, et ;
- une valeur d'aire sous un pic correspondant aux peptides cationiques ;

telle que le rapport de cette valeur d'aire sous le pic correspondant aux peptides anioniques sur la somme des valeurs d'aire sous les pics correspondants aux peptides anioniques, aux peptides neutres et aux peptides cationiques de la composition est compris entre 27,0 % et 45 % ;

la valeur de l'aire sous le pic correspondant aux peptides anioniques, la valeur de l'aire sous le pic correspondant aux peptides cationiques et la valeur de l'aire sous le pic correspondant aux peptides neutres étant déterminées par l'analyse chromatographique dans des conditions décrites ci-après :

- o en utilisant une colonne chromatographique de dimensions 100 x 7,8 mm comprenant à titre de phase stationnaire une résine hydrophile échangeuse d'anions fonctionnalisée par des groupements ammonium quaternaires, et de granulométrie de 10 µm ;
- o en utilisant à titre de première phase mobile d'élution des peptides cationiques et des peptides neutres, un tampon (C) aqueux Tris 5 mM à pH 8,35 pendant une durée de 7 minutes à compter de l'introduction en tête de colonne de la composition à analyser, puis une deuxième phase mobile d'élution des peptides anioniques dans laquelle le rapport du volume d'un

tampon (D) formé de Tris 5mM, NaCℓ 5 M à pH 8,35 sur le volume de tampon (C) augmente linéairement de 0 % à 100 % en 30 minutes ;

- avec un débit de la phase mobile de 1 mL/min dans la colonne ;
- l'analyse étant réalisée à une température de 25°C, et ;
- avec une détection par absorbance à la longueur d'onde de 214 nm en sortie de colonne

5/- Composition selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que les peptides présentent lors d'une analyse d'hydrophobie par chromatographie liquide en phase inverse, un temps de rétention compris entre 16 min et 36 min ;

ladite analyse d'hydrophobie étant réalisée dans les conditions ci-après :

- en utilisant une colonne de chromatographie de dimensions 250 x 4,6 mm présentant une phase stationnaire formée de silice greffée par des groupements butyle, d'une valeur de granulométrie de 5 µm et d'une valeur de porosité de 300 Å ;
- en utilisant à titre de première phase mobile d'élution des peptides hydrophiles, une solution (E) d'acide trifluoroacétique à 0,1% dans l'eau ultrapure pendant une durée de 7 minutes à compter de l'introduction en tête de colonne de la composition à analyser, puis une deuxième phase mobile d'élution des peptides hydrophobes dans laquelle le rapport du volume d'une solution (F) d'acide trifluoroacétique à 0,1% dans l'eau comprenant 40% d'acétonitrile sur le volume de la solution (E) augmente linéairement de 0 % à 40 % en 30 minutes ;
- avec un débit de la phase mobile de 0,6 mL/min dans la colonne ;
- l'analyse étant réalisée à une température de 40°C, et ;
- avec une détection par absorbance à la longueur d'onde de 214 nm en sortie de colonne.

6/- Composition selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce qu'elle est à l'état liquide.

7/- Composition selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce qu'elle est solide à l'état divisé.

8/- Composition selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisée en ce qu'elle est exempte d'hydrate de carbone.

9/- Composition selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisée en ce qu'elle est exempte de matière grasse.

10/- Composition selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que les peptides de la composition sont hydrosolubles.

11/- Composition selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que les peptides de la composition sont issus d'une hydrolyse enzymatique contrôlée de collagène de peau d'au moins un poisson choisi dans le groupe formé des poissons de la famille des *Pangasiidae* et de la famille des *Cichlidae*.

12/- Composition selon l'une des revendications 1 à 11 pour son utilisation à titre de médicament.

13/- Composition selon la revendication 12, pour son utilisation dans le traitement d'une pathologie digestive.

14/- Composition selon l'une des revendications 11 ou 12, pour son utilisation dans le traitement d'une candidose intestinale.

15/- Composition selon l'une des revendications 11 ou 12, pour son utilisation dans le traitement d'une inflammation digestive.

16/- Composition selon l'une des revendications 11 ou 12, pour son utilisation dans le maintien du microbiote intestinal.

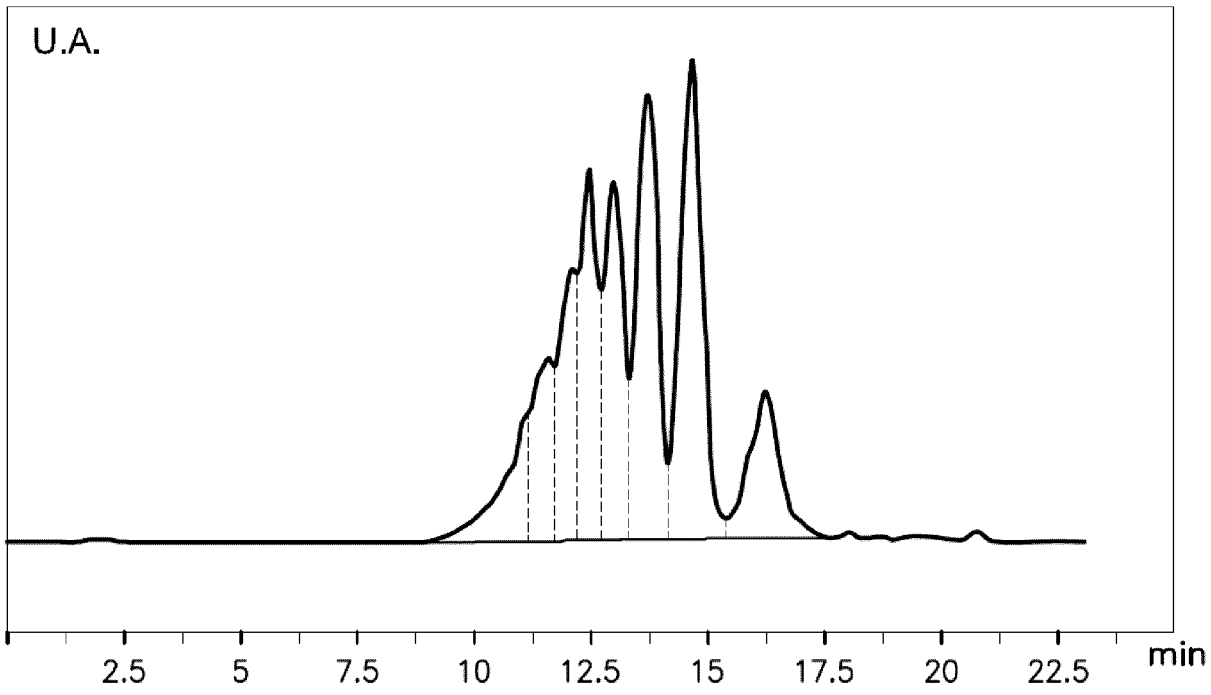
U.A.
2.5
5
7.5
10
12.5
15
17.5
20
22.5
min

Fig 1

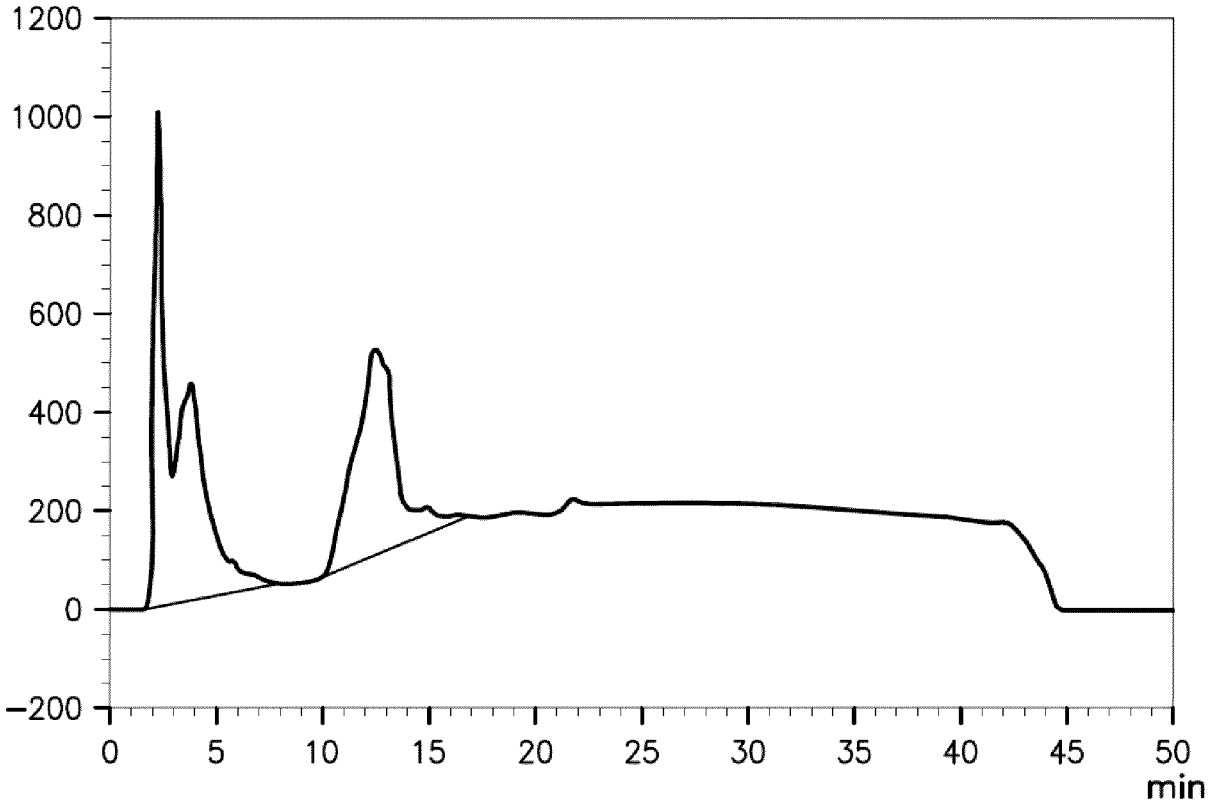
1200
1000
800
600
400
200
0
−200
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
min

Fig 2

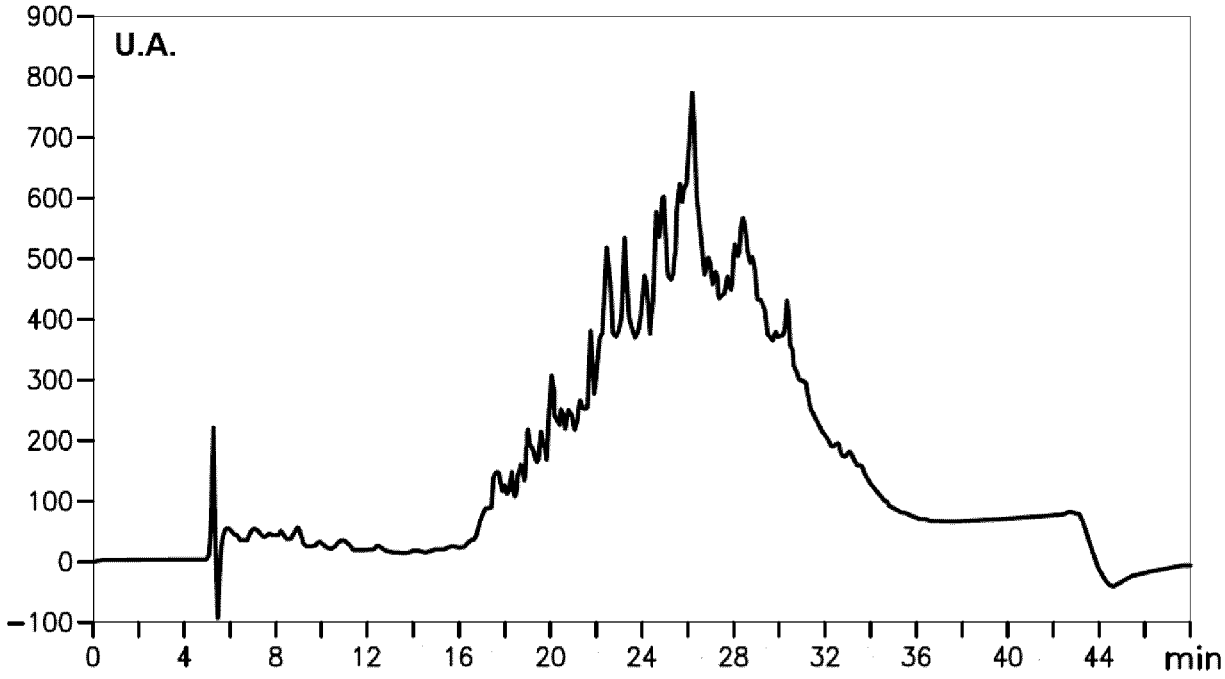
U.A.
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
−100
0
4
8
12
16
20
24
28
32
36
40
44
min

Fig 3

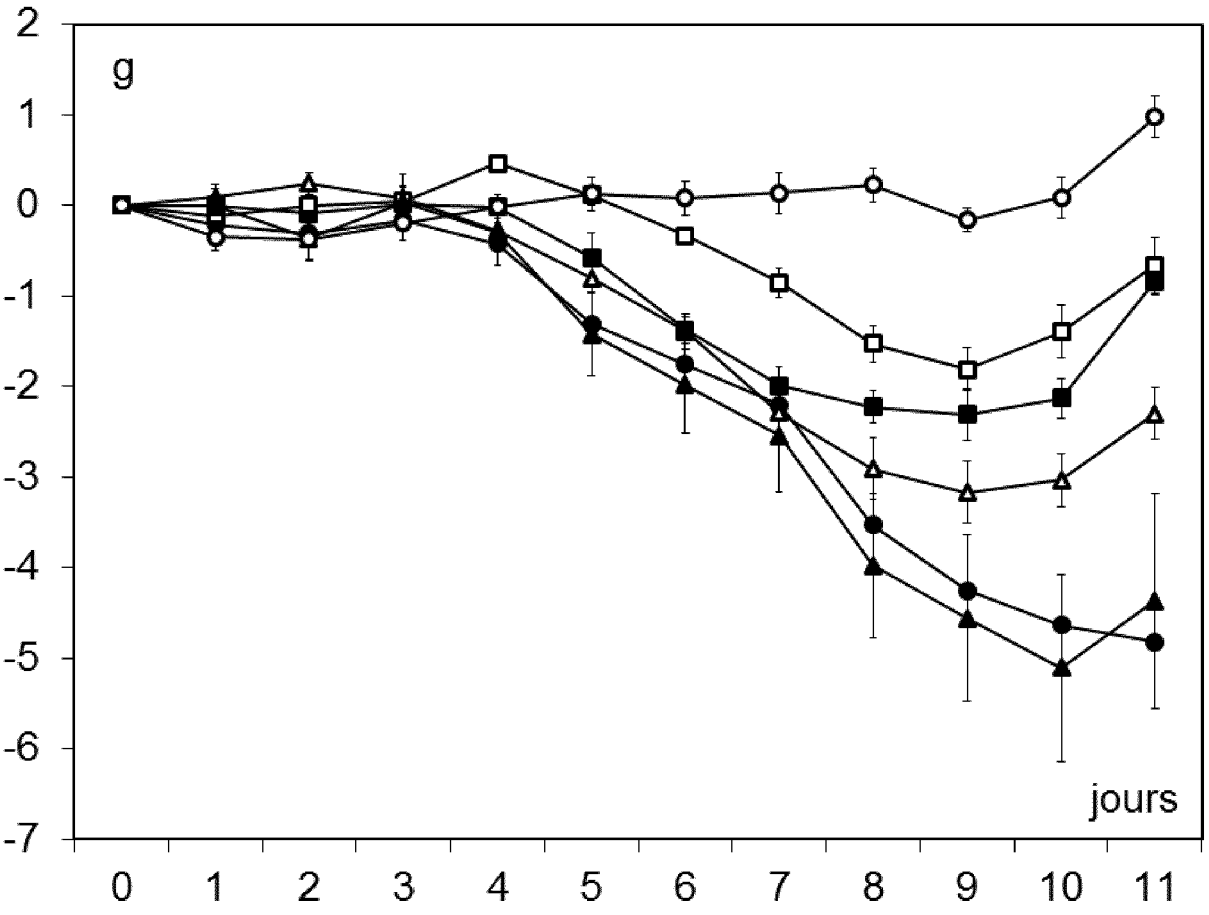
g
2
1
0
-1
-2
-3
-4
-5
-6
-7
jours
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11

Fig 4

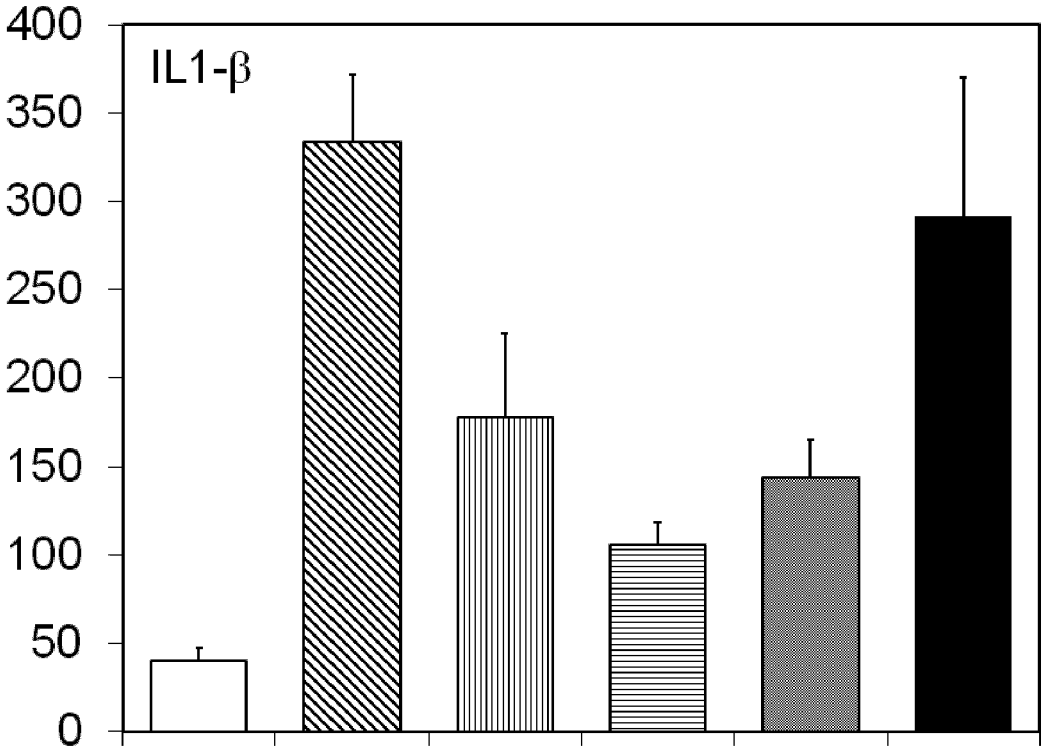

Fig 5

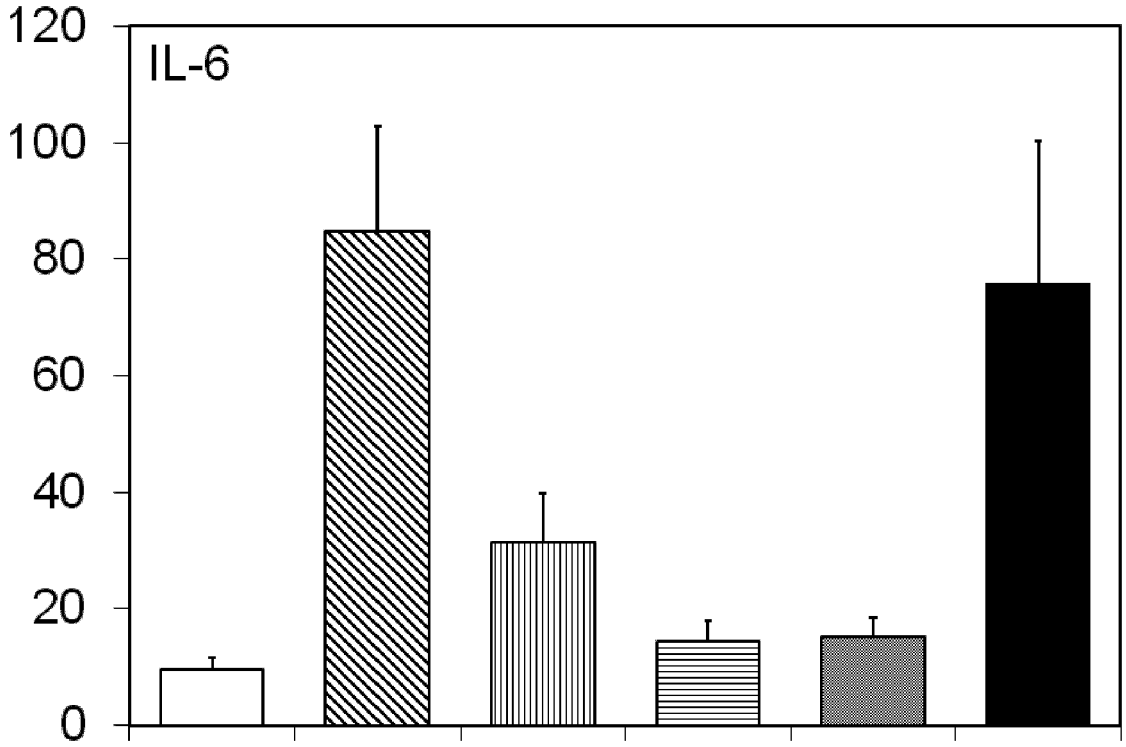

Fig 6

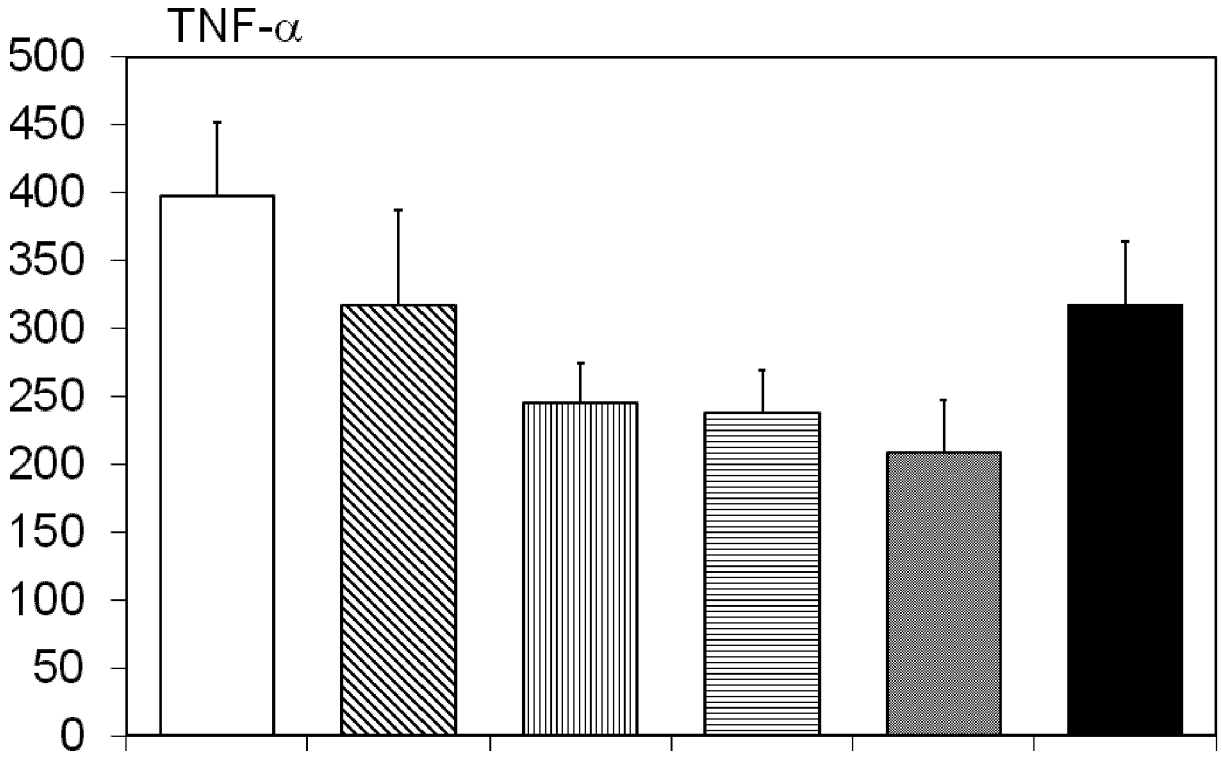
TNF-α
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0

Fig 7

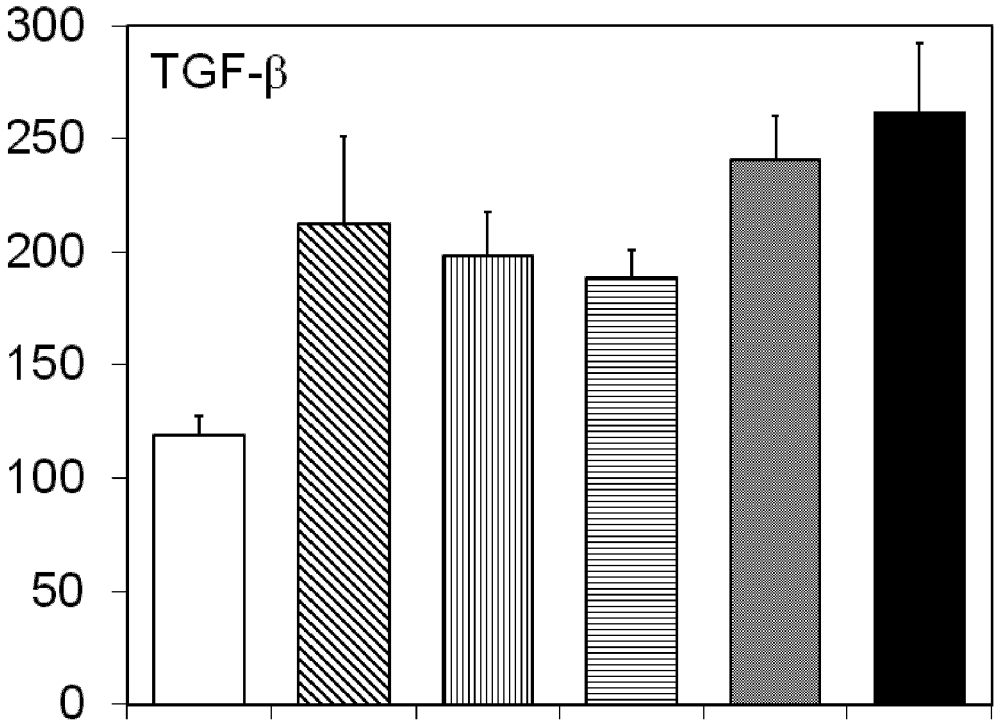
TGF-β
300
250
200
150
100
50
0

Fig 8

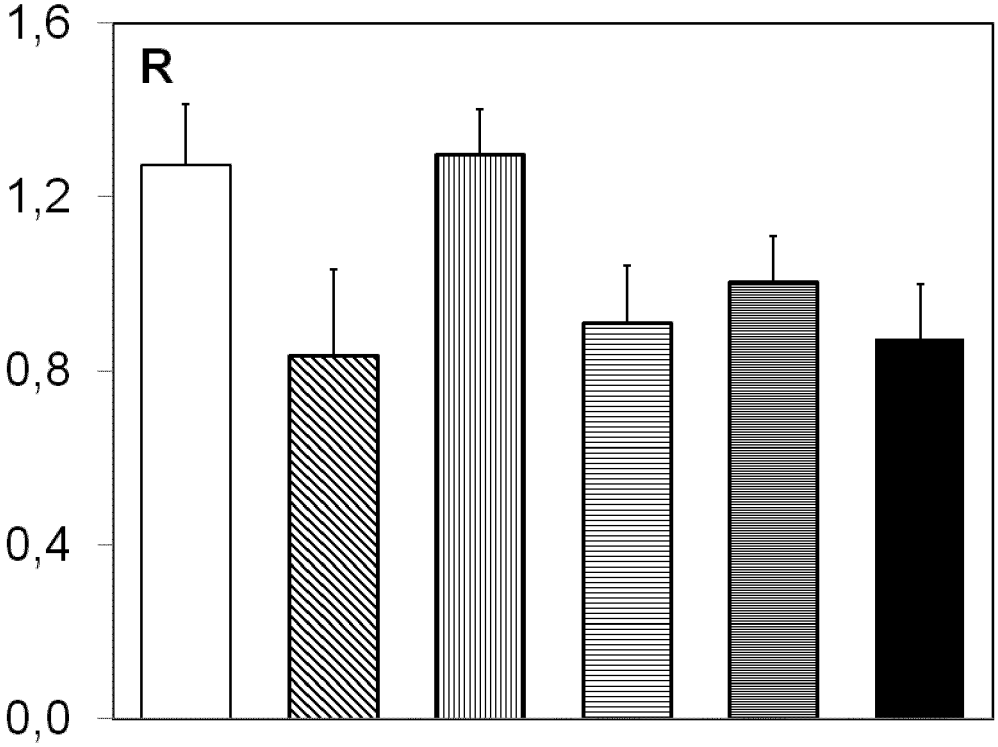

Fig 9

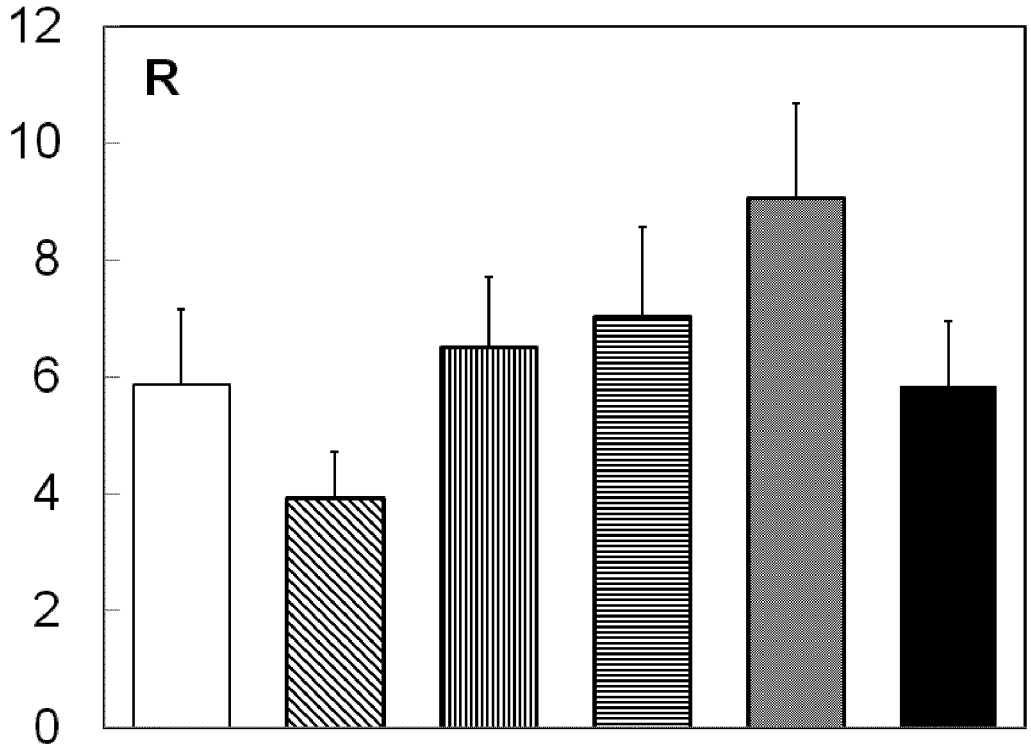

Fig 10

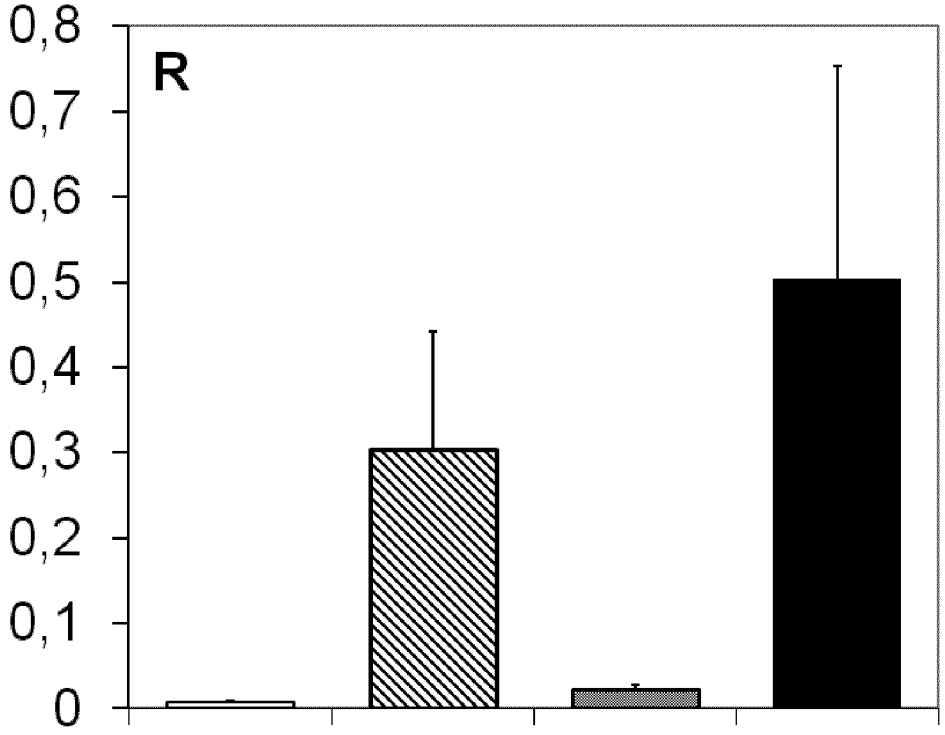

Fig 11

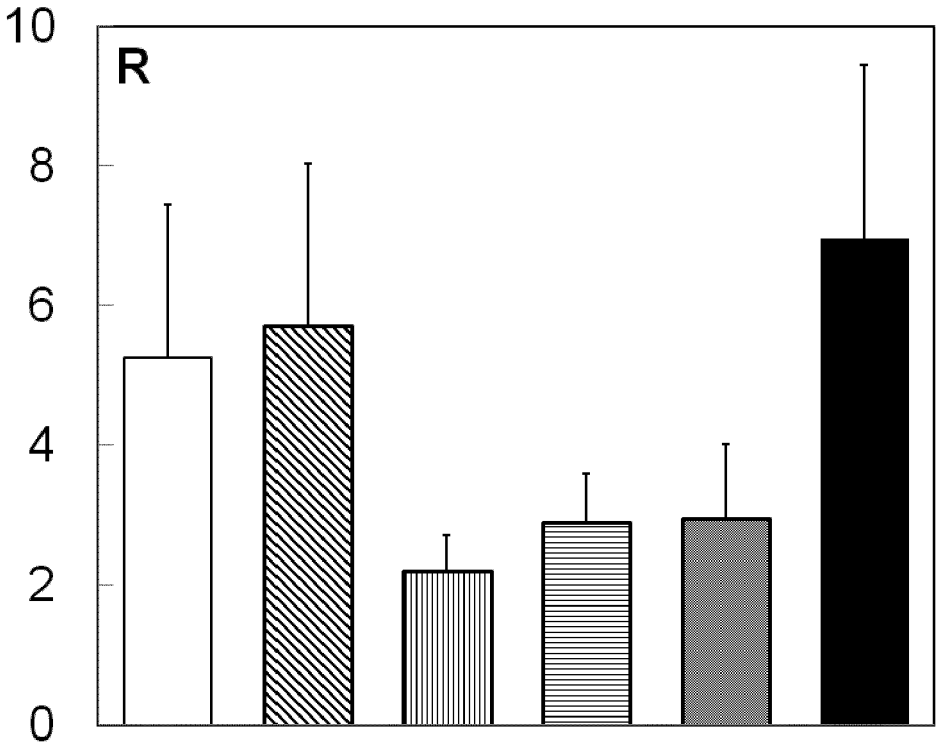

Fig 12

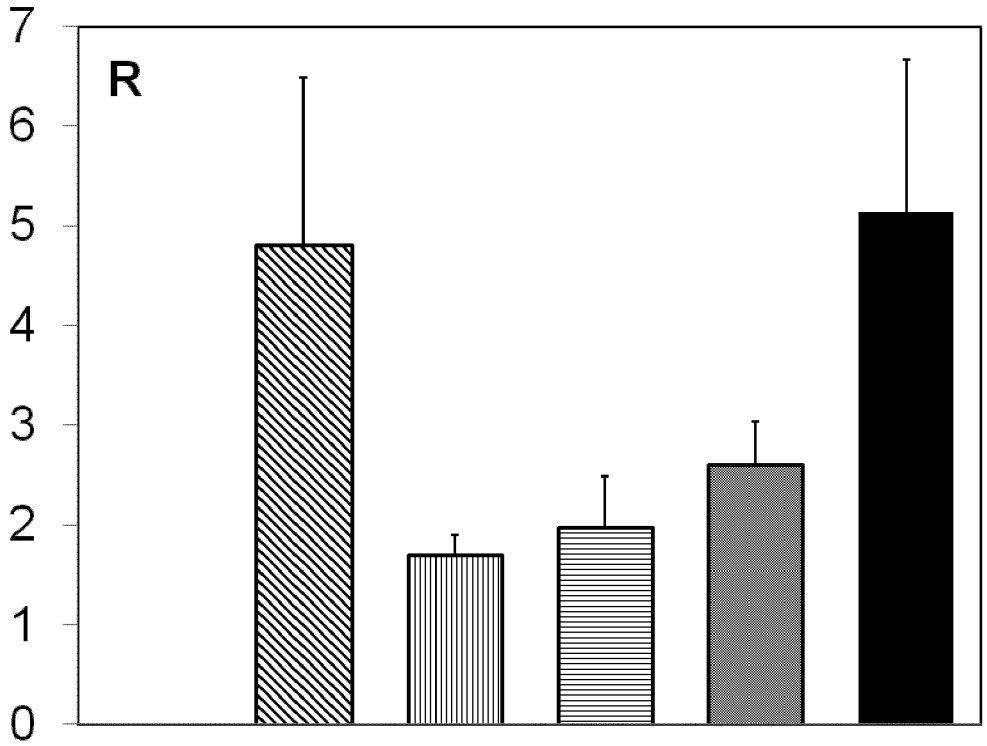

Fig 13

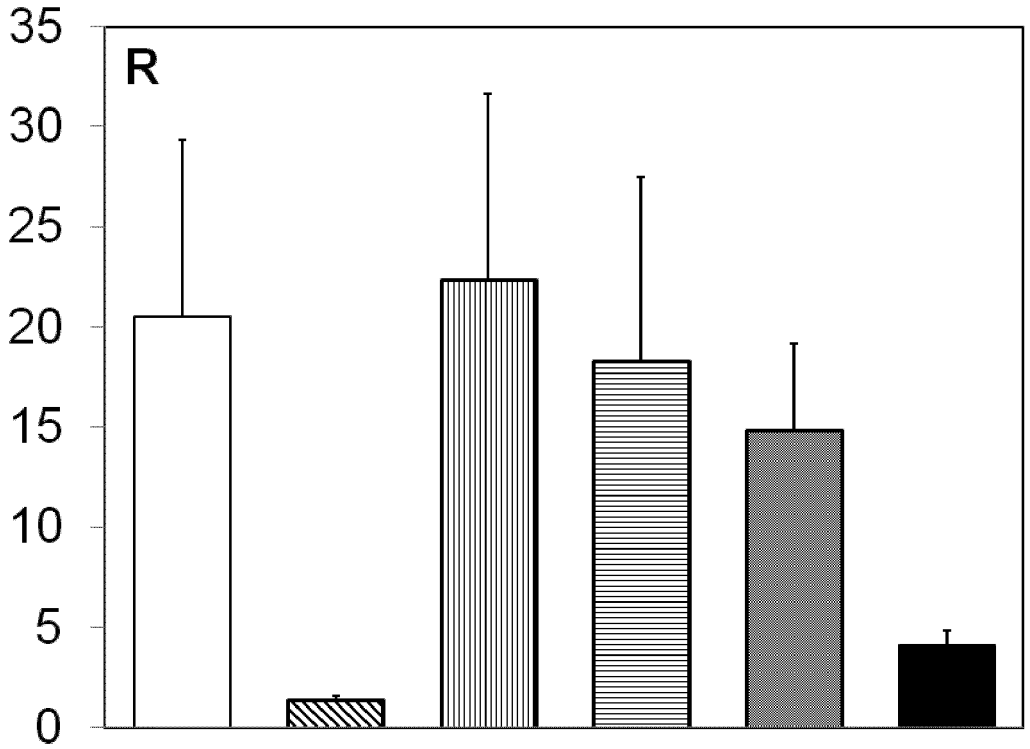

Fig 14

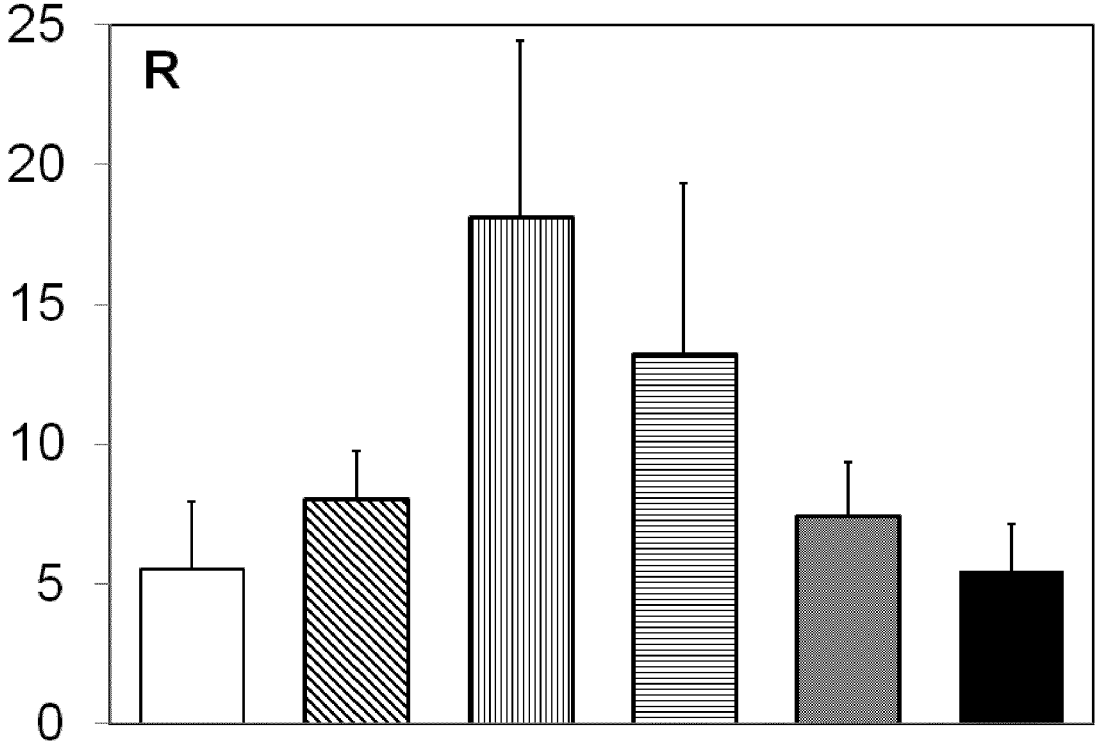

Fig 15

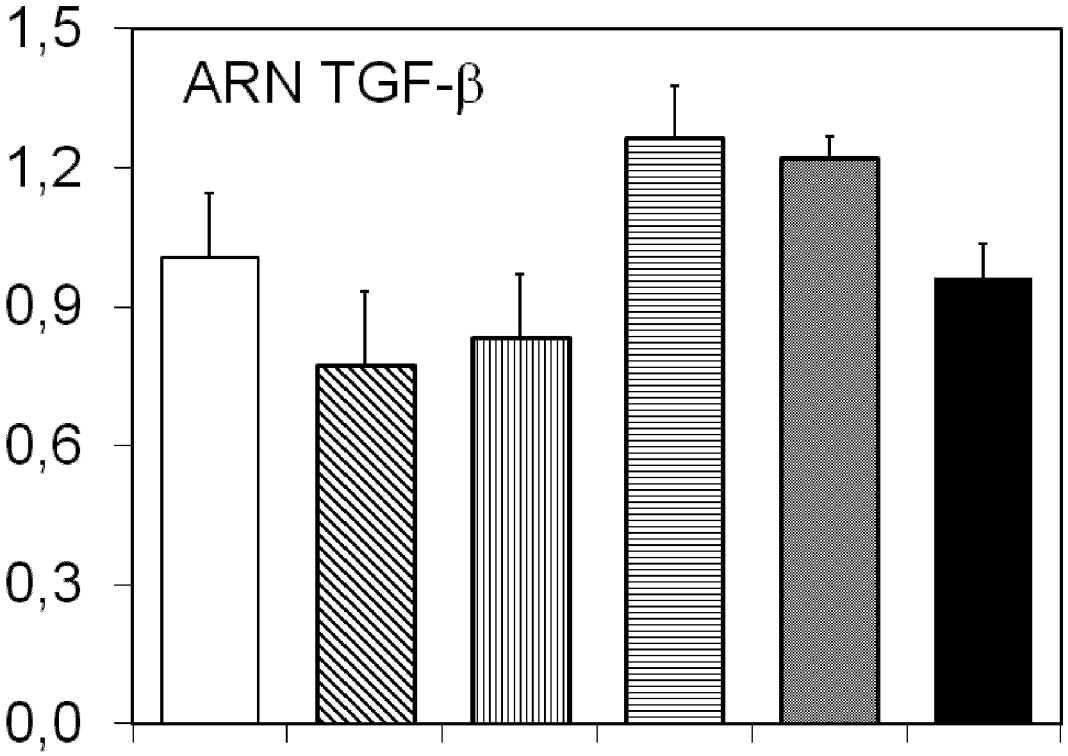

Fig 16

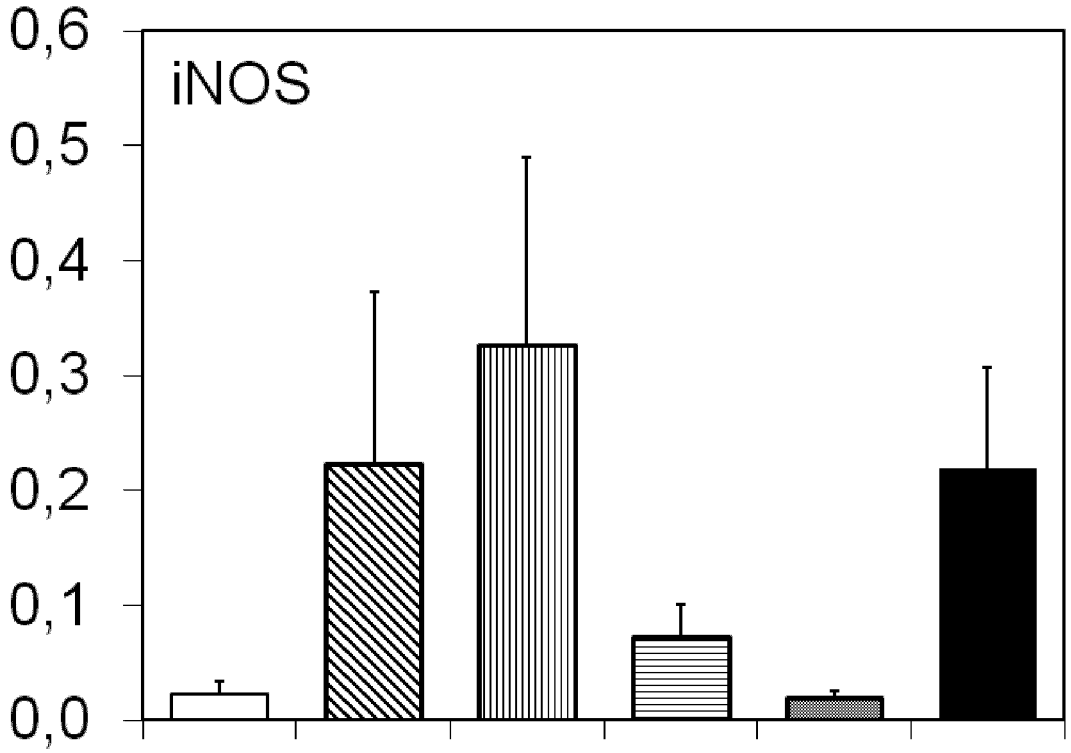

Fig 17

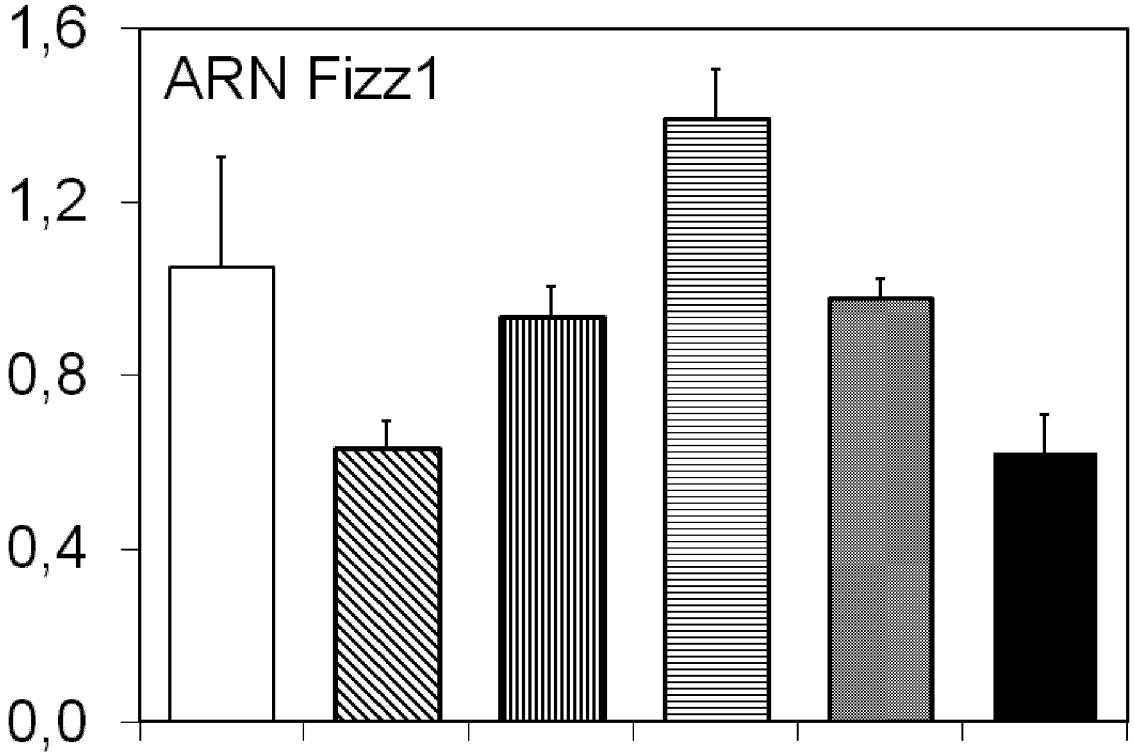

Fig 18

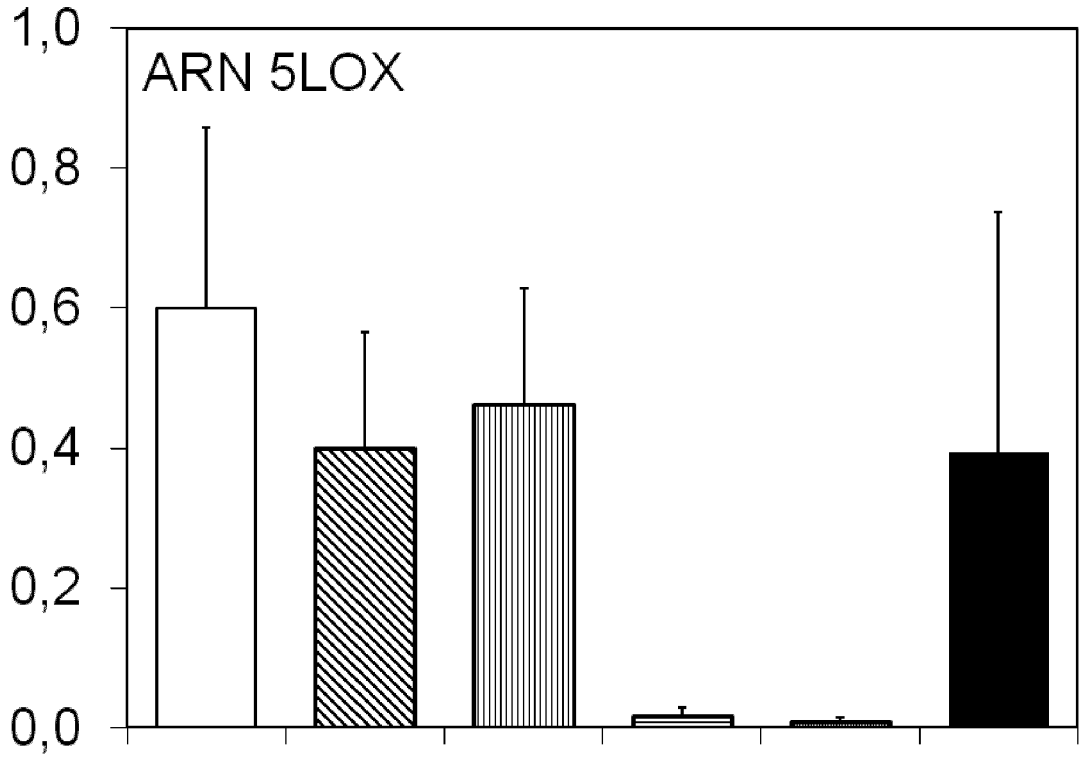

Fig 19

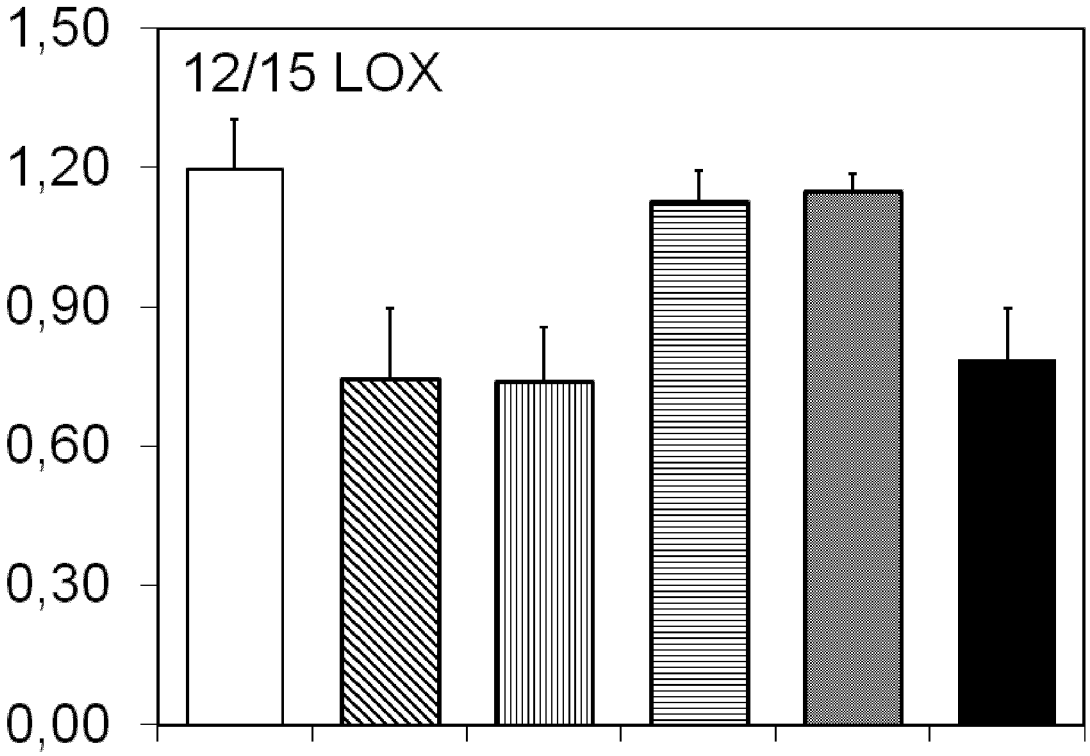

Fig 20

RAPPORT DE RECHERCHE

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

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

L'I.N.P.I. annexe à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention, au sens des articles L. 611-11 (nouveauté) et L. 611-14 (activité inventive) du code de la propriété intellectuelle. Ce rapport porte sur les revendications du brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.
Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

CONDITIONS D'ETABLISSEMENT DU PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

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

[x] Le demandeur a maintenu les revendications.

☐ Le demandeur a modifié les revendications.

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

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

☐ Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITES DANS LE PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

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

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

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

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

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

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

FR 2 720 067 A1 (DIELEN LAB [FR]) 24 novembre 1995 (1995-11-24)

RAMADASS SATIESH KUMAR ET AL: "Type I collagen and its daughter peptides for targeting mucosal healing in ulcerative colitis: A new treatment strategy", EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 91, 13 mai 2016 (2016-05-13), pages 216-224, XP029637499, ISSN: 0928-0987, DOI: 10.1016/J.EJPS.2016.05.015

CHOONPICHARN SADABPONG ET AL: "Identification of bioactive peptide fromOreochromis niloticusskin gelatin", JOURNAL OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY, SPRINGER (INDIA) PRIVATE LTD, INDIA, vol. 53, no. 2, 14 novembre 2015 (2015-11-14), pages 1222-1229, XP035965845, ISSN: 0022-1155, DOI: 10.1007/S13197-015-2091-X [extrait le 2015-11-14]

WO 2007/090504 A1 (MASTERFAM S L [ES]; QUIMERA INGENIERIA BIOMEDICA S [ES]; AGUT SANCHEZ) 16 août 2007 (2007-08-16)

WO 2010/074552 A1 (UNIVERSITI PUTRA MALAYSIA UPM [MY]; BAKAR JAMILAH [MY]; MOHAMAD RAZALI) 1 juillet 2010 (2010-07-01)

ZHANG YUFENG ET AL: "Purification and characterization of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of tilapia (Oreochromis niloticus) skin gelatin", PEPTIDES (NEW YORK), vol. 38, no. 1, novembre 2012 (2012-11), pages 13-21, XP002772867,

Stephen A Klotz1j2 ET AL: "Gelatin fragments block adherence of Candida albicans to extracellular matrix proteins", Microbiology, 1 janvier 1995 (1995-01-01), pages 2681-2684, XP055397427, Extrait de l'Internet: URL:http://www.microbiologyresearch.org/do cserver/fulltext/micro/141/10/mic-141-10-2681.pdf?expires=1502272970&id=id&accname=guest&checksum=2E6345737127ABFE65B175E4B7B8 BBFD

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

NEANT

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

NEANT