

Sécrétome bactérien pour son utilisation dans le traitement des lésions cutanées

5 DOMAINE DE L'INVENTION

La présente invention concerne une nouvelle utilisation d'un sécrétome bactérien dans le domaine du traitement des lésions cutanées et plus particulièrement de la cicatrisation. L'invention a également pour objet des compositions cosmétiques ou dermatologiques comprenant un tel sécrétome bactérien comme agent actif.

10

ART ANTERIEUR

La cicatrisation des plaies est un processus biologique complexe et dynamique qui met en jeu l'interaction de nombreux facteurs locaux et systémiques dans la réparation normale des tissus. La progression de la cicatrisation comporte trois phases interdépendantes : l'hémostase et l'inflammation, la prolifération et le remodelage (General principles of wound healing. Witte MB, Barbul A. Surg Clin North Am. 1997 Jun; 77(3):509-28.). La prolifération implique trois processus bien observables : la granulation, la contraction et la réépithélialisation.

20 Au cours de la granulation, on observe la prolifération et la migration vers le lit de la plaie des cellules qui interviendront dans le reste du processus de réparation. Ainsi, on y retrouve des macrophages, des fibroblastes et des cellules endothéliales. Les macrophages libèrent constamment des facteurs chimiotactiques et des facteurs de croissance. Les fibroblastes construisent la nouvelle matrice cellulaire nécessaire à la croissance des cellules au fond de la plaie. Cet échafaudage favorise la migration cellulaire. Enfin, les cellules endothéliales déclenchent la formation de bourgeons vasculaires qui constitueront de nouveaux capillaires, ce qui permettra de rétablir la perfusion et d'assurer l'apport en oxygène et en nutriments essentiels à l'activité métabolique des cellules dans la plaie.

30 La contraction de la plaie est un mécanisme de réduction de la taille de la plaie et les fibroblastes jouent un rôle de premier plan dans cette contraction.

La réépithélialisation consiste en la régénération d'un épiderme qui recouvre une plaie pour reformer une barrière efficace contre l'environnement extérieur, capable de se pigmenter et de retrouver ses fonctions sensorielles et immunitaires. Elle implique donc les processus cellulaires de migration et de prolifération des kératinocytes, mais
5 aussi la différenciation de ce néo-épithélium et la restauration d'une membrane basale qui reconnecte le derme et l'épiderme. Lorsque la migration des cellules basales en direction du centre de la plaie permet aux deux bords de la plaie de se rejoindre, une vague de mitose cellulaire se produit pour combler les espaces laissés par la migration et fournir des cellules pour le tissu épithélial en régénération tridimensionnelle.

10 Les étapes de prolifération des cellules kératinocytaires, de fibroblastes ou de cellules endothéliales peuvent être considérées comme un des phénomènes fonctionnels témoignant de l'activité cicatrisante d'un actif. Une augmentation de la prolifération des fibroblastes participerait à la cicatrisation d'une plaie profonde (atteinte du derme), alors que l'augmentation de la prolifération et/ou de la migration des kératinocytes
15 participerait à la réépithélialisation.

La cicatrisation pose aussi des problèmes cosmétiques à partir du moment où des défauts de cicatrisation, ou une mauvaise cicatrisation pourront être responsables de marques visibles disgracieuses et quasi permanentes telles que de cicatrices épaisses ou chéloïdes.

20 Toutes les interventions chirurgicales, de médecine esthétique, de dermatologie ainsi que les lésions traumatiques non médicales (éraflures, coupures, égratignures, brûlures) ou pathologiques entraînent des cicatrices. L'une des principales compétences des chirurgiens plastiques est de contrôler la formation de cicatrices.

La pression est, par exemple, utilisée depuis de nombreuses années pour les
25 cicatrices causées par des brûlures et elle a été plus récemment combinée à des feuilles de silicone posées directement sur la cicatrice.

Il existe toujours un besoin de proposer de nouvelles compositions pour favoriser la cicatrisation des peaux lésées ainsi que pour améliorer l'aspect esthétique des cicatrices.

30

Pour la première fois, et de manière surprenante, la demanderesse a mis en évidence les propriétés bénéfiques dans la régénération tissulaire et la cicatrisation des

lésions cutanées d'un sécrétome bactérien issu d'une souche bactérienne (ou bactérie) LMB64 isolée à partir d'une nappe phréatique.

Cette bactérie a été décrite par la Demanderesse dans la demande de brevet WO2012/085182. Plus particulièrement, il était décrit la bactérie en tant que telle pour ses activités anti-inflammatoires. Encore plus particulièrement, il était décrit et exemplifié les extraits dénommés S0, E0 et ES0, respectivement constitués du surnageant de culture séparé de la biomasse, de la biomasse de cellules lysées, et du surnageant après incubation de la culture à pH basique pendant plusieurs heures. Seules les activités pharmacologiques des extraits E0 et ES0 étaient testées et il était montré que ces extraits E0 et ES0 avaient la capacité d'induction des cytokines et de maturation des cellules de Langerhans (pour E0) ainsi que d'activation des récepteurs TLR2/TLR4/TLR5, antagonistes des récepteurs PARs et d'induction des peptides antimicrobiens (pour ES0). Ces résultats permettaient d'envisager l'utilisation de tels extraits dans le traitement de maladies inflammatoires comme le prurit, le psoriasis, l'eczéma ou encore la dermatite atopique.

Contre toute attente, la Demanderesse met ici en évidence qu'un sécrétome constitué non pas des mêmes éléments que les extraits ES0 et E0 mentionnés ci-dessus, mais constitué majoritairement des biomolécules sécrétées et externalisées dans le surnageant de culture par ladite bactérie LMB64, présente des propriétés cicatrisantes surprenantes.

DESCRIPTION DETAILLEE

Selon un premier mode de réalisation (1), la présente invention a pour objet un sécrétome bactérien d'une bactérie non-pathogène à Gram négatif appartenant à la classe des Betaproteobacteria, sous-famille des Neisseriaceae, comprenant un ARNr 16S comprenant la séquence SEQ ID No. 1, ou toute séquence présentant au moins 80% d'identité avec la séquence SEQ ID No. 1, pour son utilisation dans le traitement des lésions cutanées,

ledit sécrétome étant susceptible d'être obtenu, ou obtenu, par un procédé comprenant les étapes de :

- a) mise en culture de ladite bactérie dans un milieu de culture et des conditions adaptés à sa croissance,
 - b) séparation liquide/solide et récupération de la phase liquide,
 - c) obtention dudit sécrétome comprenant les biomolécules secrétées par
- 5 ladite bactérie dans la phase liquide.

Selon un second mode de réalisation de la présente invention, le sécrétome bactérien pour son utilisation dans le traitement des lésions cutanées selon l'invention est caractérisé en ce qu'un tampon basique est ajouté à la phase liquide obtenue à l'étape b) et que la phase liquide tamponnée obtenue est optionnellement laissée en

10 contact pendant 1 à 7 h, de préférence à une température comprise entre 1 et 6°C.

La bactérie LMB64 a été caractérisée et définie comme appartenant à la classe des Beta-proteobacteria, sous-famille des Neisseriaceae, et probablement d'un nouveau genre non encore défini. L'analyse de la séquence du gène codant pour l'ARN ribosomique (ARNr) 16S a permis de situer cette bactérie proche des genres

15 Chromobacterium, Paludimonas, Lutelia et Glubenkiana, avec lesquels elle partage 95% de similarité de séquence.

Cette bactérie, non pathogène, est une bactérie à Gram négatif qui a été isolée à partir de la nappe phréatique.

Plus particulièrement, la bactérie LMB64 se présente sous la forme d'un

20 bâtonnet d'une longueur aux alentours de 2,3µm (+/- 0,3) et d'une largeur aux alentours de 1,0µm (+/-0,1). Une particularité de cette bactérie est la présence d'un flagelle polaire.

Le gène codant pour l'ARNr 16S a été presque totalement séquencé (1487 pb, correspondant à la séquence SEQ ID No. 1). La bactérie LMB64 possède un plasmide circulaire de 10948 pb. Ce plasmide a été entièrement séquencé et la séquence est

25 représentée en la séquence SEQ ID No. 2.

Selon une autre forme de réalisation, une bactérie dont est issu le sécrétome selon l'invention comprend au moins un plasmide comprenant la séquence SEQ ID No. 2, ou toute séquence présentant au moins 80% d'identité avec la séquence SEQ ID

30 No. 2, de manière avantageuse au moins 85%, au moins 90%, au moins 95%, encore au moins 97% et plus préférentiellement encore au moins 98% d'identité avec la séquence SEQ ID No. 2.

Aussi, une bactérie dont est issu le sécrétome est une bactérie non-pathogène à Gram négatif appartenant à la classe des Betaproteobacteria, sous-famille des Neisseriaceae, ladite bactérie comprenant un ARNr 16S comprenant la séquence SEQ ID No. 1, ou toute séquence présentant au moins 80%, encore au moins 90%, au moins 95%, au moins 97% d'identité avec la séquence SEQ ID No. 1 et ladite bactérie comprenant au moins un plasmide comprenant la séquence SEQ ID No. 2, ou toute séquence présentant au moins 80% d'identité avec la séquence SEQ ID No. 2, de manière avantageuse au moins 85%, au moins 90%, au moins 95%, encore au moins 97% et plus préférentiellement encore au moins 98% d'identité avec la séquence SEQ ID No. 2.

A titre d'exemple une telle bactérie est représentée par la souche LMB64 qui a été déposée au nom de la demanderesse à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, Paris, le 8 avril 2010 sous la référence I-4290.

Ayant ces informations génotypiques, associées aux caractéristiques de croissance en milieu non sulfuré, de la nature non filamenteuse de cette bactérie, un homme du métier n'aurait pas difficulté à trouver/identifier une autre bactérie permettant d'obtenir un sécrétome selon l'invention. Une telle identification d'une autre bactérie certes légèrement différente génotypiquement mais rassemblant les critères phénotypiques de l'invention quant au sécrétome peut être réalisée après un travail de sélection qui n'est en aucun cas insurmontable et ce sur la base des informations contenues dans la présente demande ainsi que celles contenues dans la demande WO2012/085182 associées aux connaissances générales de l'homme du métier.

Par « pourcentage d'identité » entre deux séquences d'acides nucléiques au sens de la présente invention, on entend désigner un pourcentage de nucléotides identiques entre les deux séquences à comparer, obtenu après le meilleur alignement (alignement optimal), ce pourcentage étant purement statistique et les différences entre les deux séquences étant réparties au hasard et sur toute leur longueur. Les comparaisons de séquences entre deux séquences d'acides nucléiques sont traditionnellement réalisées en comparant ces séquences après les avoir alignées de manière optimale, ladite comparaison pouvant être réalisée par segment ou par « fenêtre de comparaison ».

L'alignement optimal des séquences pour la comparaison peut être réalisé, outre manuellement, au moyen de l'algorithme d'homologie locale de Smith et Waterman (1981) [Ad. App. Math. 2:482], au moyen de l'algorithme d'homologie locale de Neddleman et Wunsch (1970) [J. Mol. Biol. 48:443], au moyen de la méthode de recherche de similarité de Pearson et Lipman (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444], au moyen de logiciels informatiques utilisant ces algorithmes (GAP, BESTFIT, FASTA et TFASTA dans le Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, ou encore par les logiciels de comparaison BLAST N ou BLAST P).

Le pourcentage d'identité entre deux séquences d'acides nucléiques est déterminé en comparant ces deux séquences alignées de manière optimale dans laquelle la séquence d'acides nucléiques à comparer peut comprendre des additions ou des délétions par rapport à la séquence de référence pour un alignement optimal entre ces deux séquences. Le pourcentage d'identité est calculé en déterminant le nombre de positions identiques pour lesquelles le nucléotide est identique entre les deux séquences, en divisant ce nombre de positions identiques par le nombre total de positions dans la fenêtre de comparaison et en multipliant le résultat obtenu par 100 pour obtenir le pourcentage d'identité entre ces deux séquences.

Par exemple, on pourra utiliser le programme BLAST, « BLAST 2 sequences » (Tatusova et al., "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol Lett. 174:247-250) disponible sur le site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>, Les paramètres utilisés sont ceux donnés par défaut (en particulier pour les paramètres « open gap penaltie » : 5, et « extension gap penaltie » : 2 ; la matrice choisie est par exemple la matrice « BLOSUM 62 » proposée par le programme). Le pourcentage d'identité entre les deux séquences à comparer est calculé directement par le programme. Il est également possible d'utiliser d'autres programmes comme les logiciels « ALIGN » ou « Megalign » (DNASTAR).

Une bactérie selon l'invention comprend la bactérie LMB64 qui comprend au moins un plasmide comprenant la séquence SEQ ID No. 2, ou toute séquence présentant au moins 80 %, de préférence 85 %, 90 %, 95 % et 98 % d'identité avec ladite séquence SEQ ID No. 2. D'autres caractéristiques de ladite bactérie LMB64 seront détaillées plus loin dans les exemples.

En outre, la bactérie LMB64 a été déposée au nom de la demanderesse à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, Paris, le 8 avril 2010 sous la référence I-4290.

5 La présente invention concerne aussi selon un autre mode de réalisation un sécrétome bactérien pour son utilisation dans le traitement des lésions cutanées selon le second mode de réalisation, caractérisé en ce que le tampon basique est choisi parmi tampon Tris, tampon Arginine et leurs mélanges.

10 Dans un autre mode de réalisation, l'invention vise un sécrétome bactérien pour son utilisation dans le traitement des lésions cutanées selon l'un des modes de réalisation précédents, caractérisé en ce que l'étape b) de séparation liquide/solide est suivie d'une étape b') de clarification de la phase liquide ou de la phase liquide tamponnée par filtration avant l'étape c).

15 Dans un autre mode de réalisation, l'invention vise un sécrétome bactérien pour son utilisation dans le traitement des lésions cutanées selon le mode de réalisation précédent, caractérisé en ce que la filtration est réalisée avec un seuil de 0,2 μm .

20 Selon un autre mode de réalisation, l'invention vise aussi un sécrétome bactérien pour une utilisation dans le traitement des lésions cutanées selon l'un des modes de réalisation précédents, caractérisé en ce que lesdites biomolécules consistent en les peptides, les protéines et les métabolites secondaires sécrétés par ladite bactérie.

25 C'est aussi un autre mode de réalisation de la présente invention que de fournir un sécrétome bactérien pour une utilisation dans le traitement des lésions cutanées selon l'un des modes de réalisation précédents, caractérisé en ce que la bactérie comprend au moins un plasmide comprenant la séquence SEQ ID No. 2, ou toute séquence présentant au moins 80% d'identité avec la séquence SEQ ID No. 2.

30 Selon un autre mode de réalisation, l'invention vise aussi un sécrétome bactérien pour une utilisation dans le traitement des lésions cutanées selon l'un des modes de

réalisation précédents, caractérisé en ce que la bactérie est la bactérie déposée à la CNCM le 8 avril 2010 sous la référence I-4920.

De manière générale, le terme « sécrétome » est utilisé pour décrire l'ensemble des biomolécules sécrétées et excrétées dans le milieu de culture et solubilisées dans ce milieu, par une cellule, un tissu ou un organisme. Dans le cas présent, il faut comprendre par sécrétome l'ensemble des biomolécules sécrétées et externalisées par la bactérie LMB64, et ce sans modification ni altération ni lyse de la cellule bactérienne. Plus particulièrement, ces biomolécules consistent principalement en les protéines, les peptides et les métabolites secondaires sécrétés et externalisés par la bactérie dans le milieu de culture.

Les bactéries se multiplient par fission binaire, c'est-à-dire que chaque bactérie grandit puis se divise en deux cellules filles séparées par un septum de division formé par la paroi cellulaire. Durant la division, l'ADN se duplique ainsi que les autres constituants. Divers systèmes enzymatiques de synthèse et de dégradation participent à la division cellulaire.

La croissance bactérienne est l'accroissement ordonné de tous les composants de la bactérie. Elle aboutit à l'augmentation du nombre de bactéries. Au cours de la croissance, il se produit, d'une part, un appauvrissement du milieu de culture en nutriments et, d'autre part, un enrichissement en biomolécules sécrétées et excrétées dans le milieu de culture par la bactérie et solubilisées dans ce milieu ainsi qu'en sous-produits du métabolisme.

Par l'expression « milieu de culture » ou « milieu », il faut comprendre tout milieu comprenant au moins les nutriments nécessaires pour la croissance et la multiplication des bactéries. Les bactéries peuvent être cultivées en milieu liquide, solide ou semi-liquide. De préférence, le milieu de culture est un milieu liquide permettant la récupération du surnageant de culture contenant le sécrétome.

Un milieu de culture adéquat contient des nutriments favorisant la croissance et la multiplication des bactéries. De manière générale, un milieu de culture convenable pourra comprendre de l'eau, une source de carbone, une source d'azote et des sels. A titre illustratif, un exemple particulier de milieu de culture est décrit plus bas dans les exemples.

Par « métabolites secondaires », il faut comprendre les petites molécules qu'une bactérie selon l'invention, en particulier la bactérie LMB64, produit, secrète et excrète dans le milieu de culture. A titre illustratif, de tels métabolites secondaires peuvent être des molécules solubles comme les bactériocines, les peptides non-ribosomaux, les
5 sidérophores, les lipopeptides ou encore les polyketides ou des molécules comme les terpènes, les pyrazines, les indoles ou encore les dérivés sulfures. Les protéines présentes dans le sécrétome présentent des tailles comprises entre 10 Kd et 100 Kd, préférentiellement entre 18 Kd et 98 Kd, et de préférence une protéine majoritaire dont la taille est de 38 kDa environ.

10

En pratique, le sécrétome d'une bactérie selon l'invention, par exemple et en particulier la bactérie LMB64, peut être obtenu à partir d'une culture dans un milieu de culture permettant la croissance, le développement et la multiplication de la bactérie (comme par exemple celui décrit plus bas) par simple récupération du surnageant de
15 culture qui contient les biomolécules sécrétées constitutives du sécrétome selon l'invention. Concrètement, du fait que ces biomolécules sont sécrétées et externalisées par la bactérie et solubilisées dans le milieu, il n'est pas nécessaire de réaliser une étape de traitement desdites bactéries (mécanique ou chimique induisant lyse totale ou partielle des cellules ou encore libération de protéines ou composants de la paroi ou de
20 la membrane ou encore de l'espace périplasmique). La récupération des composants du surnageant de culture (ci-après le sécrétome) des composants cellulaires solides non solubles peut se faire par tout moyen de séparation liquide/solide. Plus particulièrement, il est donc possible, par les techniques connues par l'homme de l'art, d'isoler la fraction liquide contenant les biomolécules solubilisées de la fraction solide contenant
25 majoritairement des cellules entières, des débris cellulaires comprenant des protéines de surface et/ou des protéines localisées dans l'espace périplasmique de la bactérie.

A titre illustratif, la séparation liquide/solide peut être réalisée par une technique choisie parmi : la centrifugation, la sédimentation, la filtration, l'ultrafiltration, la
30 décantation, l'égouttage par exemple.

De manière préférée, la séparation liquide/solide est réalisée par centrifugation de la culture bactérienne afin de séparer, d'un côté la phase solide, i.e. le culot, contenant cellules et débris cellulaires et d'un autre côté la phase liquide, i.e. le surnageant, comprenant les molécules solubles, c'est-à-dire le sécrétome.

5 Le surnageant, i.e. la phase liquide, peut être utilisé tel quel, ou après simple filtration pour le débarrasser des débris cellulaires éventuellement présents et le stériliser. Il peut aussi être envisagé de le concentrer par exemple par diafiltration. Les protéines constituant le sécrétome peuvent également être récupérées par précipitation au sulfate d'ammonium.

10 Comme indiqué plus avant, le procédé de préparation d'un sécrétome bactérien selon l'invention est caractérisé en ce qu'un tampon basique est ajouté à la phase liquide obtenue à l'étape b) et que la phase liquide tamponnée obtenue est optionnellement laissée en contact d'un tel tampon pendant 1 à 7 h, en particulier à basse température, de préférence à une température comprise entre 1 et 6°C.

15 L'ajout d'un tampon basique au surnageant permet d'améliorer la solubilité et/ou la stabilité des protéines et peptides en solution.

De manière préférée ce tampon basique est un tampon Tris ou un tampon arginine ou un mélange Tris-arginine. De préférence il s'agit d'un tampon Tris-arginine.

20 La quantité de tampon basique, préférentiellement Tris-arginine ajouté à la phase liquide est telle que la phase liquide tamponnée obtenue présente une concentration en arginine comprise entre 100 mM et 500 mM et/ou une concentration en Tris comprise entre 10 mM et 90 mM.

25 Le pH de la phase liquide tamponnée pourra être compris entre 8 et 12, et de préférence entre 9 et 11.

L'emploi d'un tampon basique (Tris, Arginine ou Tris-arginine) permet de stabiliser les protéines en solution et d'éviter leur agrégation sur une longue période de stockage.

30

Un mode préféré de culture de la bactérie selon l'invention, en particulier la souche LMB64, peut comprendre trois étapes.

- Un premier inoculum peut être préparé en erlenmeyer dans un milieu adapté contenant substances minérales, protéiques et glucidiques convenables à cette préculture.
- Une seconde culture de pré-fermentation en mode batch dans un second milieu proche ou identique au premier milieu (ou tout milieu équivalent) est ensuite réalisée.
- Enfin, une fermentation en mode fed-batch dans un milieu identique ou proche du second milieu en vue d'obtenir une densité cellulaire élevée.

Une étape de centrifugation permet ensuite l'élimination des cellules et débris cellulaires et la récupération du surnageant de culture.

Ce surnageant tamponné, ou phase liquide tamponnée, peut ensuite être clarifié par filtration.

Comme indiqué plus avant, l'étape b) de séparation liquide/solide est suivie d'une étape b') de clarification de la phase liquide ou de la phase liquide tamponnée, par exemple par filtration, avant l'étape c).

La filtration pourra être réalisée par tout moyen adéquat permettant une clarification de la phase liquide, ou de la phase liquide tamponnée le cas échéant. Une telle clarification par filtration permet l'élimination des particules en suspension qui n'auraient pas été éliminées lors de l'étape de séparation liquide/solide et vise à obtenir un sécrétome limpide.

La filtration peut être réalisée par tout moyen de filtration, ultrafiltration ou diafiltration.

De manière avantageuse la filtration est effectuée par filtration sur filtre ou cartouche à filtre présentant un seuil de 0,4 μm , préférentiellement 0,2 μm . Dans ce cas, le sécrétome bactérien est caractérisé en ce que les peptides, protéines et métabolites secondaires sécrétés ont une taille inférieure ou égale à 0,2 μm .

A titre préféré, il peut être utilisé des filtres ou préfiltres non chargés électrostatiquement afin d'éviter toute absorption des biomolécules responsables de tout ou partie de l'activité.

La nature exacte des milieux ainsi que des différentes étapes sera décrite plus en
5 détails dans les exemples. Il faut comprendre que toute modification du procédé, des milieux, des enchaînements d'étapes qui paraît évidente pour un homme du métier au regard de la présente description devra être considérée comme entrant dans le champ de la présente demande de brevet.

10 Comme évoqué supra, l'invention concerne aussi dans un autre mode de réalisation, un sécrétome bactérien pour une utilisation dans le traitement des lésions cutanées selon l'un des modes de réalisation précédents, caractérisé en ce que les lésions cutanées sont choisies dans le groupe comprenant écorchures, brûlures, coups de soleil, égratignures, coupures, éraflures, sutures.

15 L'invention vise aussi un sécrétome bactérien pour une utilisation dans le traitement des lésions cutanées selon l'un des modes de réalisation précédent pour son utilisation pour l'atténuation de défauts de cicatrisation.

20 L'invention concerne aussi, dans un autre mode de réalisation, un sécrétome bactérien pour une utilisation dans le traitement des lésions cutanées selon l'un des modes de réalisation précédents, caractérisé en ce que les lésions cutanées sont des lésions post-traumatiques, post-chirurgicales, postérieures à un acte de dermatologie, postérieures à un acte de médecine esthétique.

25 De manière avantageuse, l'invention concerne aussi un sécrétome bactérien pour une utilisation dans le traitement des lésions cutanées selon l'un des modes de réalisation précédents, caractérisé en ce qu'il est associé à un sel de Cuivre ou un sel de Zinc.

30 Dans un autre mode de réalisation, l'invention vise aussi un sécrétome bactérien pour une utilisation dans le traitement des lésions cutanées selon l'un des modes de

réalisation précédent, caractérisé en ce que le traitement des lésions cutanées consiste en l'amélioration de la cicatrisation et de la réparation cutanée.

5 L'invention vise encore dans un autre mode de réalisation, une méthode de traitement cosmétique d'atténuation des défauts de cicatrisation cutanée comprenant l'application d'une quantité efficace d'une composition comprenant une quantité efficace d'un sécrétome bactérien tel que défini dans l'un des modes de réalisation précédent en association avec un excipient cosmétiquement approprié et formulée sous une forme adaptée pour une application topique.

10 De manière avantageuse, l'invention concerne aussi un sécrétome bactérien pour une utilisation dans le traitement des défauts de cicatrisation selon l'un des modes de réalisation précédents, caractérisé en ce qu'il est associé à un sel de Cuivre et/ou un sel de Zinc.

15 Ainsi, l'invention vise encore dans un autre mode de réalisation, l'utilisation d'un sécrétome bactérien tel que défini dans l'un des modes de réalisation précédent pour le traitement cosmétique d'atténuation des défauts de cicatrisation cutanés. Selon un mode de réalisation particulier le sécrétome selon l'invention est utilisé en combinaison avec un sel de Cuivre et/ou un sel de Zinc.

20 Dans un autre mode de réalisation, l'invention vise une composition dermatologique comprenant un sécrétome bactérien tel que défini dans l'un des modes de réalisation 1 à 9 et un excipient dermatologique approprié pour une application topique. Dans un mode de réalisation avantageux, la composition dermatologique
25 comprend en outre un sel de Zinc et/ou un sel de Cuivre.

Dans un autre mode de réalisation, l'invention vise encore une composition dermatologique selon l'un des modes de réalisation précédents pour son utilisation dans le traitement des lésions cutanées. Dans un mode de réalisation avantageux, la
30 composition dermatologique comprend en outre un sel de Zinc et/ou un sel de Cuivre.

Dans un autre mode de réalisation, l'invention vise une composition cosmétique comprenant un sécrétome bactérien tel que défini dans l'un des modes de réalisation

précédents et un excipient cosmétique approprié pour une application topique. La composition cosmétique peut en outre comprendre un sel de Zinc et/ou un sel de Cuivre.

Enfin, dans un autre mode de réalisation, la présente invention vise une utilisation d'une composition cosmétique selon un mode de réalisation précédent pour le traitement cosmétique d'atténuation des défauts de cicatrisation cutanés.

Selon une forme d'exécution, l'invention a pour objet un sécrétome bactérien tel que défini dans un des modes de réalisation précédent, pour une utilisation topique destinée à favoriser la prolifération des fibroblastes.

Selon une forme d'exécution, l'invention a pour objet un sécrétome bactérien tel que défini dans un des modes de réalisation précédents, pour une utilisation topique destinée à favoriser la prolifération et/ou la migration des kératinocytes.

Selon une forme d'exécution, l'invention a pour objet un sécrétome bactérien tel que défini dans un des modes de réalisation précédents, pour une utilisation topique destinée à traiter les lésions cutanées

Selon une forme d'exécution, l'invention a pour objet un sécrétome bactérien tel que défini dans un des modes de réalisation précédents, pour une utilisation topique destinée à améliorer la cicatrisation et la récupération cutanées.

Un autre objet de l'invention concerne une composition destinée à accélérer la réparation cutanée afin de rétablir l'intégrité et la qualité de la peau comprenant en tant que principe actif le sécrétome défini dans un des modes de réalisation précédents. De façon encore avantageuse, la composition peut comprendre en outre un sel de Cuivre et/ou un sel de Zinc.

De façon préférée, la concentration du sécrétome dans une composition selon l'invention est comprise entre 0,05% et 10 %. De façon plus préférée, elle est comprise entre 0,1% et 5%.

La composition selon l'invention comprend, en outre, un ou plusieurs excipients usuels dermatologiquement et/ou cosmétologiquement compatibles connus de l'homme de l'art en vue d'obtenir une composition pour l'application topique, tels que des

émulsionnants, des épaississants, des gélifiants, des fixateurs d'eau, des agents d'étalement, des stabilisants, des colorants, des parfums et des conservateurs.

Dans la présente invention, on entend désigner par « dermatologiquement ou cosmétiquement acceptable » ce qui est utile dans la préparation d'une composition dermatologique ou cosmétique, qui est généralement sûr, non toxique et ni biologiquement ni autrement non souhaitable et qui est acceptable pour une utilisation dermatologique ou cosmétique, et en particulier dermatologique ou dermo-cosmétique, notamment par application topique.

Les compositions selon l'invention sont avantageusement destinées à une application topique, en particulier sur la peau.

La composition selon l'invention peut être préparée sous la forme d'une émulsion, d'une dispersion, d'une lotion aqueuse ou huileuse.

15

Dans un autre mode de réalisation particulier, la composition dermatologique ou cosmétique selon l'invention comprend au moins un autre principe actif, plus particulièrement au moins un actif hydratant.

Cet autre principe actif pourra ainsi notamment être sélectionné dans le groupe comprenant :

- Agents cicatrisants ou réparateurs bien connus : panthénol, madecassoside, allantoin, aloe vera, miel ;
- Agents anti infectieux : oligo éléments type cuivre-zinc, miel
- Agents hydratants et nourrissants : glycérine, beurre de karité, cires naturelles, acide hyaluronique, acides gras
- Agents apaisants : allantoin, bisabolol, panthenol, enoxolone
- Filtres UV.

De façon préférée, le deuxième principe actif sera un oligo-élément type cuivre-zinc. Dans ce mode de réalisation préféré, la composition de l'invention comprendra donc le secrétome et l'oligoélément type cuivre-zinc.

Comme évoqué, une composition dermatologique ou cosmétique selon l'invention comprenant le secrétome pourra comprendre un sel de cuivre ou un sel de

zinc. De manière préférée le sel de cuivre sera le sulfate de cuivre. De manière avantageuse le sel de Zinc sera choisi parmi l'oxyde de zinc et le sulfate de zinc.

La quantité de sulfate de cuivre dans une composition selon l'invention pourra varier entre 0.05 et 0.5% en poids de la composition, préférentiellement entre 0.1 et 0.25%, en poids de la composition, plus préférentiellement encore environ 0.2% en poids de la composition.

La quantité de sulfate de zinc dans une composition selon l'invention pourra varier entre 0.05 et 0.5%, en poids de la composition, préférentiellement entre 0.1 et 0.4%, en poids de la composition, plus particulièrement entre 0.1 et 0.2% en poids de la composition.

La quantité d'oxyde de zinc dans une composition selon l'invention pourra varier entre 0.5 et 10%, en poids de la composition, préférentiellement entre 1 et 5%, en poids de la composition, plus particulièrement environ 2 à 4% en poids de la composition.

Selon une forme d'exécution de l'invention, il est envisagé une composition selon l'un des modes de réalisation précédents caractérisée en ce qu'elle comprend en outre au moins un autre principe actif choisi parmi les cicatrisants, les anti-infectieux, les agents hydratants, les apaisants et leurs mélanges. Selon un autre mode de réalisation particulier, au moins un autre principe actif sera choisi parmi les agents hydratants, les agents cicatrisants, les agents apaisants et leurs mélanges, de préférence les agents hydratants. Un tel principe actif sera utilisé de préférence dans des compositions dermatologiques.

La présente invention concerne également une méthode pour traiter et cicatriser des lésions cutanées comprenant l'administration, de préférence topique, d'une quantité efficace d'une composition comprenant en tant que principe actif un sécrétome selon l'invention.

Les compositions selon l'invention sont destinées notamment aux soins des peaux ayant subi des lésions.

Des lésions cutanées peuvent apparaître à la suite de traumatismes ou à la suite d'actes médical ou chirurgical, invasif ou non invasif, curatif ou à visée esthétique.

Comme actes médical ou chirurgical invasifs on peut citer : actes chirurgicaux (exérèses, shavings) avec ou sans suture, la cryothérapie, le laser ablatif, les peelings moyens ou forts, la suture, la mésothérapie ou encore le curetage par exemple.

Comme lésions cutanées post traumatiques, par exemple faisant suite à une
5 altération extérieure légère de la peau, on peut citer les coupures, griffures, égratignures et les brûlures superficielles ou les coups de soleil par exemple.

Comme acte médical non invasif superficiel nécessitant un produit cicatrisant qui accélère la récupération cutanée, utilisable au long cours (jusqu'à réparation complète de la peau) on peut citer les peelings légers, les épilations au laser, les
10 traitements vasculaires superficiels (couperose), par exemple.

Le traitement des lésions de la peau et des muqueuses selon l'invention pourra notamment comprendre le traitement des coupures, des sutures, des écorchures, des éraflures, des égratignures, des cicatrices post-chirurgie ou post-acte de dermatologie
15 esthétique, des brûlures superficielles, des coups de soleil.

La présente invention porte, en outre, sur l'utilisation d'une composition cosmétique selon l'invention destinée à l'amélioration de la cicatrisation et de la réparation cutanée et en particulier pour l'atténuation des défauts de cicatrisation.

20 L'invention sera mieux comprise à la lecture des exemples ci-dessous qui l'illustrent sans en limiter la portée.

Les exemples font références aux figures suivantes

FIGURE 1 : Gel SDS-PAGE des protéines du SecrétoMe.

25 Piste 1 (M, marqueurs poids moléculaires standards, Sea Blue).

Pistes 2 à 5 : (Sec sécrétome avant addition de tampon Arginine) – dépôts de 10 µl, 15 µl, 20 µl et 30 µl respectivement.

Pistes 6 à 9 : (Sec + Arg, sécrétome après addition de tampon Arginine) – dépôts de 10 µl, 15 µl, 20 µl et 30 µl respectivement.

30

FIGURE 2 : % stimulation de prolifération (moyenne $\pm$ sem) des fibroblastes humains normaux traités avec les différents par comparaison aux cellules contrôle (n=3 pools de donneurs).

5 **FIGURE 3 :** % stimulation (moyenne $\pm$ sem) de la migration de la lignée de kératinocytes HaCaT traités avec les différents composés par comparaison aux cellules contrôle (n=2).

FIGURE 4 : Réépithélialisation (moyenne $\pm$ sem) de la blessure après application pendant 48h sur des explants d'oreilles de porc des différents produits par
10 comparaison à une crème réparatrice référente (n=10 donneurs indépendants).

Exemple 1 : Culture de la bactérie LMB64

A titre d'exemple non limitatif, des milieux de culture préférés contiennent du chlorure d'ammonium, du sulfate de magnésium et de l'extrait de levure. A noter
15 également, comme cela ressort entre autres de la demande WO2012/085182, d'autres milieux similaires pourront être utilisés et doivent donc être considérés comme faisant partie intégrante de la présente description. Toute adaptation de l'Homme de l'Art doit également être considérée comme partie de l'invention.

Un exemple de procédé de culture est décrit ci-dessous. Il convient de rappeler
20 ici que cet exemple n'a de valeur qu'illustrative et ne doit aucunement être considéré comme limitatif.

La souche LMB64 est cultivée en trois étapes, à savoir un premier inoculum, une préculture (ou préfermentation) en mode batch et enfin une culture mais en mode fed-batch (ajout de glucose).

25 **Inoculum :** Un tube de la WCB LMB64 est utilisé pour ensemer un Erlenmeyer contenant 1000 mL de milieu stérile. L'erenmeyer est ensuite placé dans le shaker incubateur sous agitation Lorsque la densité cellulaire du bouillon est suffisante, la culture est arrêtée. Les cellules sont alors mises en refroidissement jusqu'à transfert dans le préfermenteur.

30 **Préculture :** Le préfermenteur est ensuite rempli avec environ 16 L de milieu puis stérilisée à plein.

Deux flacons satellites sont connectés sur le préfermenteur après stérilisation de la cuve puis des blocs d'ajout :

- un flacon contenant une solution stérile de glucose à 50%. Cette solution (Glucose batch préculture) est transférée immédiatement dans le milieu de culture pour atteindre la concentration initiale de glucose de 20 g/L

- L'ermenmeyer contenant l'inoculum décrit plus haut à l'étape **Inoculum** estensemencé dans le préfermenteur.

La préculture est lancée puis régulée automatiquement. A titre d'exemple, il peut être mentionné les paramètres suivants : Température, Vitesse d'agitation, Pression, Débit d'air, ou encore PO_2 .

La croissance des cellules est suivie par une mesure de la densité optique à 620 nm. La préculture est arrêtée par refroidissement lorsqu'elle atteint une densité suffisante.

Culture : Le fermenteur est ensuite rempli avec 127 L de milieu ajusté à pH 7,0 puis stérilisé à plein. Trois flacons satellites sont utilisés :

- un flacon contenant une solution stérile de glucose. Cette solution est transférée immédiatement dans le milieu de culture pour atteindre la concentration initiale de glucose de 20 g/L.

- un flacon d'antimousse. Cet antimousse sera ajouté automatiquement pendant la culture pour contrôler le niveau de mousse dans la cuve.

- un flacon de glucose fedbatch. Cette solution sera ajoutée en cours de culture pour supporter la croissance des cellules.

La culture est lancée puis régulée automatiquement. A titre d'exemple, il peut également être mentionné les paramètres suivants : Température, pH, Agitation, Pression, débit d'air PO_2 .

Après épuisement du glucose initialement présent dans le milieu (remontée de PO_2), l'ajout de la solution glucose fedbatch est déclenché et permet une croissance des cellules à haute densité La fermentation est arrêtée après consommation totale du glucose. A ce stade, le mout de fermentation est refroidi automatiquement. Tout au long

de la culture, la croissance des cellules est suivie par une mesure de la densité optique à 620 nm. La quantité de biomasse sèche (g/L) obtenue en fin de culture est déterminée en utilisant une méthode pondérale.

5 **Exemple 2 : Extraction du sécrétome**

L'exemple ci-dessous est donné à titre illustratif d'un mode de réalisation préféré, mais ne doit pas être considéré comme limitatif.

Le sécrétome est obtenu de manière générale après centrifugation du résultat de l'étape de culture afin d'éliminer les cellules, les protéines de surface et les protéines localisées dans l'espace périplasmique de la bactérie. Cette étape de centrifugation est suivie d'un ajout d'un tampon basique Tris-Arginine au surnageant. Une dernière étape de filtration du surnageant est également possible. Toute adaptation de l'Homme de l'Art doit également être considérée comme partie de l'invention.

15 **Centrifugation** : La ligne de transfert du fermenteur à la centrifugeuse est stérilisée. Le moût de fermentation est ensuite séparé par centrifugation continue sur une centrifugeuse. La centrifugation est conduite à 150 L/h (+/-30 L/h) avec une vitesse de rotation du bol de 10900±1000 rpm. Le surnageant est récupéré dans un container équipé d'une poche à usage unique. Le poids du surnageant est mesuré sur le plateau
20 balance.

Ajout Arginine : Le tampon d'extraction Tris Arginine est stérilisé puis transféré dans la poche à usage unique contenant le surnageant de culture. Le temps de contact nécessaire est compris entre 1 et 7 heures. La concentration cible en Tris et arginine après ajout dans la poche à usage unique est aux alentours de 0,3 M en L-arginine et 20 mM en Tris.

Le volume total après ajout du tampon d'extraction est d'environ 240 L.

30 **Filtration** : Deux étapes de filtration sont réalisées en ligne, afin de clarifier le surnageant et aboutir à un sécrétome clair exempt de germes. Le pilotage de la filtration

est réalisé grâce au système de filtration/répartition. La cartouche de filtration en profondeur à usage unique est placée dans son carter de filtration. La totalité du produit filtré est récupéré stérilement dans un container équipé d'une poche à usage unique. La poche de produit filtré est pesée sur le plateau balance puis stockée à +5°C jusqu'à
5 répartition.

Gel électrophorèse des protéines du sécrétome : voir Figure 1

Gel SDS-PAGE (4 – 12%) Bis-Tris, dans des conditions dénaturantes et réduites, révélation au Bleu de Comassie des dépôts de différents volumes de surnageants de culture (10, 15, 20, 30 µl respectivement) avant et après ajout du tampon Arginine. On observe dans les 2 cas des différentes bandes de protéines de taille entre 14 et 100 Kda, dont une bande majeure environ à 38 Kda.
10

Exemple 3 : Effet du sécrétome sur la prolifération des fibroblastes humains normaux
15

La technique utilisée est celle de l'incorporation d'un nucléotide, la 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU), analogue de la thymidine, dans l'ADN des cellules en phase S, à 37°C. Cette technique permet de quantifier les cellules dont l'avancée dans le cycle cellulaire est caractéristique d'une cellule proliférative (phase S ou de synthèse de l'ADN).
20

Les fibroblastes sontensemencés en plaque de 96-puits puis incubés pendant 72h en présence des composés à tester, l'EGF comme contrôle positif et le sécrétome à 0,4, 0,6 et 1%. L'incorporation de BrdU est réalisée durant les dernières 24h. L'incorporation de BrdU est quantifiée à l'aide du kit ELISA BrdU (ref. 11647229001, Roche Diagnostic).
25

Le % du contrôle est calculé selon la formule :

$$(\text{Valeur} / \text{moyenne du contrôle}) \times 100$$

La stimulation en % est calculée selon la formule :

$$\text{Moyenne de Stimulation en \%} = (\text{Moyenne (Valeur} / \text{moyenne du contrôle)} \times 100) - 100$$

30

$$\text{SEM} = \text{standard dev} / \sqrt{n}$$

Les analyses statistiques sont faites en utilisant le test de Student. Les études ont été réalisées sur 3 pools de donneur.

Le contrôle positif EGF, a stimulé fortement et significativement la prolifération des fibroblastes et de façon reproductible sur les 3 pools donneurs (95% de stimulation). Ceci valide les expérimentations. Les résultats montrent que le sécrétome testé à 0,4%, 0,6% et 1% a stimulé de façon significative la prolifération des fibroblastes humains normaux. Le tableau 1 ci-dessous regroupe les résultats de l'incorporation de BrdU (moyenne $\pm$ sem) par les fibroblastes humains normaux (par dosage ELISA) après 72h d'incubation en présence des composés testés (n=3 pools de donneurs). Les résultats sont illustrés par la Figure 2.

Tableau 1

Composé	contrôle	EGF 10 ng/ml	Sécrétome 0,4%	Sécrétome 0,6%	Sécrétome 1%
Moyenne % control	100	195	138	134	127
sem	2	10	6	4	3
Moyenne % stimulation	0	95	38	34	27
sem	2	10	6	4	3
Student's Test	-	***	***	***	***

Exemple 4 : Effet du sécrétome sur la migration de la lignée kératinocytaire HaCaT

Les études ont été réalisées à l'aide du Kit de migration cellulaire Oris Cell Migration Assay (Platypus Technologies) selon le protocole standard recommandé par le fabricant. Principalement, les cellules de la lignée HaCaT (Lignée cellulaire Humaine de kératinocytes) sontensemencées en plaque de 96-puits les stoppeurs Oris™ sont ôtés et les composés à évaluer sont ajoutés au milieu de culture. L'incubation se poursuit pendant 24 h pour permettre la migration des cellules. Un traceur fluorescent perméable aux cellules, la calcéine est alors ajoutée pour permettre la visualisation des cellules dans la zone délimitée par les stoppeurs.

La migration cellulaire est évaluée par la prise d'images des puits et mesure de la surface de migration en mm^2 .

Le % du contrôle est calculé selon la formule :

(Valeur / moyenne du contrôle) x 100

La stimulation en % est calculée selon la formule :

$$\text{Moyenne de Stimulation en \%} = (\text{Moyenne (Valeur / moyenne du contrôle)} \times 100) - 100$$

5 SEM = standard dev / $\sqrt{n}$

Les analyses statistiques sont faites en utilisant le test de Student.

Les études sont réalisées sur 6 répliquas techniques et en n=2 expériences indépendantes.

Les contrôles positifs, le TGF-b et le sérum de veau fœtal (FCS), ont stimulé
10 fortement et significativement la migration des cellules et de façon reproductible (51% et 176% de stimulation respectivement). Ceci valide les expérimentations. Les résultats montrent que le sécrétome testé à 0,4%, 0,6% et 1% a stimulé de façon significative la migration des kératinocytes HaCaT. Le tableau 2 ci-dessous regroupe les résultats de la migration des cellules HaCaT après 24 h d'incubation avec les différents composés
15 (n=2). Les résultats sont illustrés par la Figure 3.

Tableau 2

composé	contrôle	FCS 10%	TGF-b 10 ng/ml	Sécrétome 0,4%	Sécrétome 0,6%	Sécrétome 1%
Moyenne % control	100	276	151	267	266	272
sem	5	9	7	8	10	9
Moyenne % stimulation	0	176	51	167	166	172
sem	5	9	7	8	10	9
Student's Test	-	***	***	***	***	***

20

**Exemple 5 : Effet du sécrétome sur la fermeture de la plaie sur un modèle
ex vivo de cicatrisation**

Des explants cutanés d'oreilles de porc sont maintenus en survie. Des biopsies de 6mm sont réalisées au centre desquelles une plaie est formée de 3 mm circulaire. La
25 plaie altère l'épiderme entier ainsi que le derme supérieur. Les produits à évaluer sont appliqués en topique. Quarante-huit heures après, les biopsies sont congelées et une coloration hémalum-éosine est réalisée sur coupe. La cinétique de réépithélialisation est évaluée selon le procédé suivant :

1) Attribution d'un score défini de 0 à 3 selon le protocole développé par J. Brandner (Pollok et al, 2010, J Cell Mol Med).

Mesure précise en μm de l'étendue de la zone réépithélialisée à partir de la bordure de la plaie. Un test de Student est réalisé pour la significativité.

5 2) L'aspect morphologique en bordure de la plaie est aussi évalué et permet de rendre compte de la qualité de la préservation du tissu.

Préparations des produits à appliquer : le sécrétome a été incorporé à 0,4%, 0,6% et 1% en poids dans la même base de formulation que celle d'une crème réparatrice.
10 référente (crème Cicalfate®) testée en parallèle. L'évaluation de la réépithélialisation est faite par comparaison à cette crème référente.

Les résultats montrent un effet dose avec le sécrétome sur la progression de la réépithélialisation de la blessure. La formulation contenant le sécrétome à 1% accélère significativement la progression de fermeture de la blessure par rapport à la crème
15 réparatrice référente ($p=0,043$). Par ailleurs, l'analyse morphologique des tissus montrent une excellente tolérance des formulations contenant le sécrétome. Les résultats sont représentés à la Figure 4.

* * *

20

Exemple de composition : émulsion huile dans eau

	Sécrétome selon l'exemple 2 :	0,1-5%
	Glycérine :	1-30%
25	Hexylène glycol :	0,1 – 7%
	Cétéaryl glucoside :	0,1 – 1%
	Cétéaryl alcool :	0,9 – 4%
	Acide stéarique :	0,5-4%
	Glycéryl stéarate :	0,1-4%
30	Huile végétale :	0,1-10%
	Eau	qsp 100%