(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication : **2 714 065**
(à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)

(21) N° d'enregistrement national : **94 06715**

(51) Int Cl[6] : C 07 K 14/44, C 12 P 21/02, A 61 K 39/002, G 01 N 33/569

(12) DEMANDE DE BREVET D'INVENTION A1

(22) **Date de dépôt** : 01.06.94.

(30) **Priorité** : 16.12.93 BR 9305075.

(43) **Date de la mise à disposition du public de la demande :** 23.06.95 Bulletin 95/25.

(56) **Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire :** *Ce dernier n'a pas été établi à la date de publication de la demande.*

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

(71) **Demandeur(s) :** *FUNDACAO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ Société de droit brésilien* — BR.

(72) **Inventeur(s) :** Tendler Miriam, Katz Naftale et Simpson Andrew John.

(73) **Titulaire(s) :**

(74) **Mandataire :** Bouju Derambure (Bugnion) S.A.

(54) Antigène visant à conférer une immunité protectrice contre les helminthiases chez l'homme et l'animal et procédé de vaccination pour l'application dans l'immunoprophylaxie des helminthiases.

(57) La présente invention se rapporte à un matériau antigénique dérivé d'un helminthe, capable d'induire une protection efficace et durable contre des parasites, en particulier à des antigènes qui procurent une immunité protectrice contre les helminthes.

FR 2 714 065 - A1

La présente invention se rapporte en général à un matériau antigénique dérivé d'un helminthe, capable d'induire une protection efficace et durable contre des parasites, en particulier à des antigènes qui procurent une immunité protectrice contre les helminthes.

Parmi les helminthes, les trématodes digénétiques ou douves englobent plus de 100 familles. La majorité d'entre eux sont des parasites comparativement inoffensifs vivant dans l'intestin et d'autres organes des vertébrés et ont par conséquent fort peu retenu l'attention des parasitologues. Les trématodes qui engendrent une maladie sérieuse chez l'homme sont les douves du sang, ou schistosomes, et les douves du foie et les douves du poumon, qui sont de très importants parasites infectant les animaux.

Fasciola, la plus importante des douves du foie, est principalement parasitaire chez les ruminants domestiques et est responsable de pertes économiques sérieuses dans le monde entier (bovins, ovins et caprins).

La maladie a pour caractéristique principale la destruction des tissus hépatiques de l'hôte et la lésion des canaux biliaires, caractéristique responsable de la pathologie, de la morbidité et de la mortalité qui frappent les animaux mentionnés. La morbidité est plus élevée chez les animaux jeunes qui sont particulièrement touchés, deviennent émaciés et meurent. Les *Fasciola* peuvent également parasiter l'homme lorsque l'occasion leur en est donnée et se rencontrent plus fréquemment à Cuba et dans les pays d'Amérique latine. Cependant, la véritable douve du foie humaine est un autre parasite, à savoir *Clonorchis sinensis*, qui est répandu en Chine, au Japon, en Corée, au Viêt-Nam et en Inde. La pathologie est essentiellement provoquée par l'épaississement des parois des canaux biliaires et, dans les cas sévères, entraîne une cirrhose du foie et le décès.

Les *Fasciola* et les *Clonorchis* parviennent à entrer passivement sous la forme de métacercaires ingérées avec la nourriture (herbes et poisson cru pour *Fasciola* et *Clonorchis*, respectivement), mais leur voie de migration à travers l'organisme hôte des vertébrés vers les canaux biliaires diffère.

Tandis que les *Clonorchis* apparaissent dans l'arbre biliaire, partant de l'intestin et passant par l'ampoule de Vater, les *Fasciola* migrent à travers la

cavité abdominale, pénétrant successivement la paroi intestinale et le parenchyme du foie, entraînant de plus graves lésions des tissus hôtes.

En ce qui concerne la fasciolase chez l'animal domestique, les résultats sont contradictoires, et rares sont les arguments qui laissent supposer que les ovins ou les caprins acquièrent une immunité contre *Fasciola hepatica* (Sinclair, 1967) après immunisation par des extraits bruts.

Il existe également des arguments qui démontrent que l'infection peut persister pendant au moins 11 ans chez des ovins contaminés expérimentalement (Durbin, 1952). Il a également été décrit une réaction très faible, voire nulle, de l'hôte à l'encontre du parasite ; la survie des ovins est donc entièrement fonction du nombre de métacercaires ingérées (Boray, 1969). Les bovins sont considérés comme étant plus résistants : *F. hepatica* séjourne généralement chez cet hôte de 9 à 12 mois, mais ce sont les jeunes veaux et génisses qui présentent la forme clinique de fasciolase la plus sévère.

On a tenté à diverses reprises d'identifier des antigènes immunoprophylactiques qui pourraient constituer une base solide pour la mise au point d'un vaccin efficace contre la fasciolase. Pour l'essentiel, deux démarches expérimentales distinctes ont été suivies par plusieurs scientifiques reposant sur : 1) l'immunité induite par des vaccins vivants irradiés et 2) l'immunité induite par des vaccins non vivants.

On trouve cependant dans la littérature quelques essais relatifs à la résistance acquise à *Fasciola hepatica* chez le veau faisant intervenir des extraits de douve somatique (Ross, 1967 ; Hall et Lang, 1978, Hillyer, 1979) et faisant état de données contradictoires.

L'immunité induite par les vaccins vivants irradiés a également débouché sur des résultats frustrants au cours d'expériences conduites chez la souris, le lapin ou le mouton (Campbell *et al*, 1978 ; Hughes, 1963), puisqu'il n'apparaît aucun signe de développement d'une immunité chez ces animaux après administration de métacercaires irradiées.

En outre, les expériences menées avec différents extraits de substances excrétoires/sécrétoires issues de douves adultes au niveau biliaire se sont avérées non immunogènes, en montrant que les animaux vaccinés ont présenté une faible protection et des lésions pathologiques du parenchyme du foie.

Comme le montre l'art antérieur, on peut s'attendre que les bovins répondent mieux à la vaccination par des vaccins non vivants, mais il subsistait un doute quant à savoir si ce type de prévision était également applicable aux ovins, compte tenu de la médiocre protection conférée par un certain nombre d'antigènes différents chez les animaux expérimentaux.

L'induction d'une immunité protectrice contre *F. hepatica* au moyen d'une immunité hétérologue a également été envisagée par Campbell *et al.* (1977), qui ont montré que l'infection des moutons par *Cysticercus tenuicollis*, qui est l'étape métacestode du ténia du chien, *Taenia hydatigena*, produisait une protection

partielle contre *F. hepatica*, mais Hughes *et al.* (1978) n'ont cependant pas pu confirmer ce résultat. D'autres expériences ont été également dans l'incapacité d'induire une protection contre *Fasciola hepatica* sur les animaux expérimentaux avec ce ténia.

Les souris infectées par des adultes bisexuels de *S. mansoni* ont développé une résistance statistiquement significative à *F. hepatica* et des infections simultanées par les deux parasites ont abouti à un nombre réduit de schistosomes établis et à une production réduite d'oeufs de *schistosomes* par ver (Christensen *et al.*, 1978). Des veaux infectés par *S. bovis* ont montré aussi une certaine résistance à *F. hepatica et* des dommages moins prononcés des tissus du foie (Sirag *et al.* 1981).

Pelley et Hillyer, 1978, Hillyer et de Atica, 1980, ont fait état d'antigènes communs entre *F. hepatica* et *Schistosoma mansoni* trouvés dans l'oeuf de *Schistosoma.* Un autre résultat qui indique qu'une immunité à réaction croisée est la manifestation de réactions faussement positives dans des zones où les deux parasites sont endémiques. Hillyer, 1985, et Hillyer *et al.*, 1987, ont démontré aussi qu'un mélange d'antigènes dérivés de *Fasciola hepatica* peut conférer une protection contre l'infection subséquente par à la fois *F. hepatica* et *Schistosoma mansoni.*

La schistosomiase, ou bilharziose, est une maladie d'origine hydrique très ancienne, identifiée par les Egyptiens il y a 4000 ans et elle constitue aujourd'hui un problème de santé publique au niveau mondial, dont on estime qu'il affecte plus de 200 millions de personnes dans les zones urbaines et périurbaines du tiers-monde. Les trois principaux schistosomes infectant l'homme sont transmis par des mollusques

d'eau douce et des larves nageant librement, appelées cercaires, qui sont présentes dans l'eau et sont capables de pénétrer directement la peau de l'hôte. Après avoir migré du derme, via les poumons, vers le système de porte hépatique, les schistosomes viennent vivre dans les petites veines mésentériques ou pelviennes, où chaque femelle pond plus de 100 oeufs par jour dans le système sanguin. La réaction immunitaire de l'hôte à ces oeufs, qui viennent se loger dans les tissus, est largement responsable de cette maladie chronique débilitante et souvent fatale. L'extension des projets d'irrigation, la construction de barrages et la concentration des populations humaines contribuent aujourd'hui à l'augmentation de la propagation et de l'intensité de l'infection par le schistosome. La lutte contre les mollusques et la chimiothérapie sont les principales méthodes de lutte, mais ces méthodes ne sont en rien satisfaisantes. Un vaccin efficace serait l'objectif final pour contribuer considérablement aux efforts pour éradiquer cette maladie.

Une variété d'espèces hôtes peuvent développer une résistance partielle à *Schistosoma mansoni* consécutive à une infection antérieure ou à une immunisation avec une cercaire atténuée par une radiation (Smithers & Doenhoff, 1982). L'état antérieur de rémission concernant la possibilité d'une immunisation expérimentale contre l'infection *S. mansoni* (Clegg & Smith, 1978) a été remplacée par l'enthousiasme actuel en faveur de la possibilité de produire un vaccin défini et efficace contre le parasite avec des vaccins morts (Tendler, 1987). Néanmoins, la restriction majeure demeure le degré incomplet de protection réalisé sur les animaux, dans la plupart des

expériences, avec des antigènes parasites purifiés et chimiquement définis. Comme il a été décrit par plusieurs auteurs et révisé par Smithers, 1982, il existait un consensus général concernant le besoin d'augmenter le taux de protection induit par l'immunoprophylaxie expérimentale. Toutefois, la mise en oeuvre d'un bon modèle animal pour le développement d'un vaccin efficace contre la schistosomiase a été très difficile à réaliser. Les progrès sont tributaires de l'identification et de la purification de molécules antigéniques hautement efficaces qui provoqueraient une immunité protectrice. (*Schistosoma mansoni* : *Protective Antigens* (Antigènes protecteurs), M. Tendler - Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, Vol. 82, Suppl. IV : pp. 125 à 128, 1987).

Dans des études antérieures sur la recherche d'antigènes réalisant une immunité protectrice contre les schistosomes, nous avons fait état de l'utilisation d'un mélange complexe de constituants de schistosomes (appelé SE) libérés précocément pendant l'incubation de vers adultes *S. mansoni* vivants et fraîchement perfusés dans une solution saline tamponnée de phosphate (Tendler & Scapin, 1979 ; Kohn *et al.*, 1979). Se centrant sur l'effort visant à réaliser une protection contre l'infection par cercaires en utilisant un vaccin, un modèle expérimental a été conçu, sur deux animaux hôtes entrecroisés différents, la souris SW et les rats NZ, connus pour être totalement sensibles et partiellement résistants à l'infection par *S. mansoni* respectivement.

Sur le modèle *S. mansoni* du lapin de Nouvelle-Zélande, il a été possible d'établir un schéma fiable d'infections percutanées, avec des charges de vers adultes plutôt homogènes, pour ce qui est du nombre et

de la taille des parasites et des rapports mâle/femelle, pendant une longue période après l'infection (Tendler, 1982, 1985, 1986). Une argumentation récente suggère que l'utilisation du lapin en tant qu'hôte expérimental peut représenter un nouveau modèle d'immunité pour la maladie (Almeida *et al.*, 1987).

Les expériences d'immunisation effectuées chez des lapins avec le mélange SE ont abouti à de très hauts taux de protection à l'épreuve (Scapin *et al.*, 1980 ; Tendler, 1980 ; Tendler *et al.*, 1982) (réduction moyenne de 90 % de la charge de vers chez les animaux immunisés par rapport à des témoins normaux appariés quant au sexe et à l'âge, lorsqu'ils sont mis à l'épreuve simultanément avec le même nombre et le même groupe de cercaires actives provenant de la souche brésilienne LE de *S. mansoni*). Les souris SW immunisées avec SE étaient aussi protégées de façon significative contre une épreuve avec des cercaires normales et étaient totalement résistantes à une infection létale (Tendler, 1986). Pour mesurer la résistance, les animaux vaccinés et mis à l'épreuve, et les témoins en parallèle, sont soumis à une perfusion hépatique et mésentérique pour la détermination des charges de parasites adultes. Le degré de protection est calculé par la différence du nombre des parasites récupérés chez les animaux témoins par rapport aux animaux vaccinés (Tendler *et al.*, 182).

A la lumière des constatations *in vitro* selon lesquelles les anticorps formés contre différents stades du cycle de vie du parasite sont efficaces dans des essais de cytotoxicité éosinophiles ou dépendants d'un complément (Grzych *et al.*, 1982 ; Smith *et al.*, 1982), la caractérisation des antigènes reconnus par

les sérums provenant d'hôtes manifestement immuns est utilisée pour identifier les molécules antigéniques concernées par l'immunité protectrice (Bickle *et al.*, 1986 ; Horowitz & Arnon, 1985). Des expériences Western blot ont été effectuées pour analyser la production d'anticorps des lapins vaccinés avec SE. Au sondage des antigènes SE avec une série d'antisérums dérivés de lapins immunisés par le même schéma (SE-FCA), les auteurs ont pu démontrer dans des immunoblots deux séquences distinctes de reconnaissance des antigènes SE chez ces individus. De façon intéressante, certains antigènes SE étaient reconnus de façon restreinte seulement par les antisérums provenant de lapins presque totalement protégés. Cette découverte a permis aux auteurs d'identifier deux sous-groupes d'antigènes dans SE : l'un commun à tous les antisérums de lapin individuels, et le second sous-groupe limité aux animaux très protégés. Ces deux séquences ont été respectivement dénommées séquences basse et haute protection et utilisées en tant qu'anticorps "différentiels". Profitant de ces deux séquences de reconnaissance des constituants de SE par les anticorps polyclonaux de lapin qui répondaient "différentiellement" au même schéma d'immunisation (probablement compte tenu de la variation individuelle, censée se produire chez des populations entrecroisées), la stratégie de criblage des répertoires d'ADNc avec ces sérums a été appliquée. Avec la contrainte de l'incomplète compréhension des mécanismes critiques de la réaction de protection tant dans la schistosomiase expérimentale que la schistosomiase humaine, les modes opératoires de sélection adoptés par d'autres comprenaient fréquemment l'utilisation de sérums humains infectés (individus "supposés" immuns ou

"sensibles" de zones endémiques [Carter & Colley, 1986] ou de sérums monoclonaux ou polyclonaux choisis provenant d'animaux immunisés [Lanar *et al.*, 1986 ; Balloul *et al.*, 1987]), qui se dirigent contre plusieurs antigènes non caractérisés.

Lors des tentatives initiales de clonage moléculaire de constituants de SE potentiellement protecteurs, deux répertoires d'ADNc provenant de vers adultes entiers de *S. mansoni* et de *S. japonicum*, construits par les Drs Klinkert, université d'Heidelberg, et Donnelson/Henkle, université de l'Iowa, respectivement, ont été sélectionnés avec des filtres doubles par sélection différentielle. Un parallèle a pu être fait avec les résultats des immunoblots dans la mesure où deux groupes différents de clones ont été détectés, ce qu'on suppose correspondre à la différence de reconnaissance par les sérums anti-Se de lapins sensibles et résistants. Dans des expériences supplémentaires visant à identifier les constituants de SE, nous avons comparé dans des immunoblots des sérums anti-Se polyclonaux de lapins (haute et basse protection) avec un antisérum de lapin à de la paramyosine de schistosome purifiée (aimablement fournie par le Dr A. Sher, NIH). Cette protéine est une molécule récemment définie, partiellement protectrice contre une infection d'épreuve par *S. mansoni* chez des souris entrecroisées (Lanar *et al.*, 1986), de Mr(x10-3)97, qui s'est révélée être sensible à la dégradation protéolytique en deux produits majeurs de décomposition de Mr(x10-3)95 et 78 (Pearce *et al.*, 1986).

Le complexe 97/95/78 kD a été reconnu tant par les sérums anti-Se haute et basse protection que par les sérums anti-paramyosine monospécifiques. Les sérums

anti-Se "haute" protection reconnurent, en plus de la paramyosine, d'autres polypeptides qui restaient à être bien caractérisés et évalués au niveau de leur activité protectrice et de leur rôle immunologique. La découverte de la paramyosine en tant que constituant de SE renforce les études d'immunofluorescence indirecte précédentes effectuées sur des sections de schistosomes adultes avec des sérums anti-Se de lapin, qui ont réagi avec les oeufs sur la surface du parasite et entre les couches de muscles (Mendonça *et al.*, 1987), d'une façon semblable à celle démontrée pour la paramyosine (Pearce *et al.*, 1986). Cette découverte était aussi parallèle aux résultats de l'immunosélection des répertoires d'ADNc effectué, comme mentionné ci-dessus. A nouveau, des clones de paramyosine communs ont été isolés tant avec les sérums anti-paramyosine qu'avec les sérums anti-SE, des clones supplémentaires étant reconnus seulement par les seconds sérums de lapin (haute protection). Parmi les autres constituants de SE de poids moléculaire plus bas, le doublet 31/32 kD, décrit comme candidats potentiels pour le diagnostic de la schistosomiase (Klinkert *et al.*, 1987) et récemment identifié sous la forme de protéases situées dans l'intestin des schistosomes, a aussi été identifié (Klinkert *et al.*, 1988). Ces antigènes et d'autres antigènes qui ont été identifiés dans l'extrait salin ont présenté une très faible protection à l'essai.

L'incubation de schistosomes fraîchement perfusés dans des milieux chimiquement définis (STP) visait l'extraction d'antigènes précocément libérés par des vers adultes vivants (en particulier les substances excrétoires/sécrétoires et les constituants du tégument). Cette stratégie a été adoptée compte tenu des tentatives antérieures frustrantes pour induire une

résistance importante contre une infection par schistosomes avec différents extraits crus de *S. mansoni,* qui pouvaient théoriquement être épuisés des antigènes de fonction appropriés. Cette prémisse a été principalement influencée par les modes opératoires d'extraction communément adoptés, qui dérivaient de l'utilisation de parasites morts. En fait, en utilisant du SE émulsifié dans du FCA (en tant qu'adjuvant préférentiel) et administré par la voie sous-cutanée/-intradermique, nous obtenons une protection haute et à long terme chez deux hôtes animaux expérimentaux contre l'infection par *S. mansoni*. La raison pour l'utilisation du modèle lapin, inhabituelle dans des essais de protection, était d'obtenir l'identification initiale d'antigènes potentiellement protecteurs et discrets chez un hôte partiellement résistant (à tester encore chez les hôtes sensibles) qui pourraient par conséquent "amplifier" la réaction immunitaire et les mécanismes des effecteurs de la mort des parasites puisque les lapins sont de puissants producteurs connus d'anticorps.

Les études sur la réaction immunitaire induite chez des animaux vaccinés visant à l'identification des constituants protecteurs de SE fonctionnels appropriés, du site et des mécanismes de la mort des parasites, et des marqueurs de protection étaient au centre de nos efforts ces dernières années, mais les renseignements sur la composition moléculaire de SE, ainsi que sur l'identification et l'isolement de ses constituants protecteurs n'ont été disponibles que récemment.

Le brevet des Etats-Unis 4396000 publié le 2 août 1983 au nom de Luigi Messineo & Mauro Scarpin (selon le certificat de réexamen 461^{e} B1 4396000 publié le 11 février 1986, il a été annulé) décrivait un extrait

de vers adultes de *Schistosome mansoni,* obtenu par incubation dans un tampon chlorure de sodium-phosphate de sodium 0,15 M (pH 5,8), qui contient des glucides protéiques, et un acide nucléique et/ou des sous-produits de ce dernier constituant, et qui se sépare en quatre fractions majeures par chromatographie sur gel dans des colonnes de Séphadex G-100 et G-200. Les essais d'immunodiffusion avec un sérum anti-extrait total de lapin ont révélé trois lignes de précipitation correspondant aux fractions I et II, et une à III ou IV. Les lapins immunisés avec cet extrait total se sont révélés être totalement ou partiellement (au moins 77 %) résistants à une infection d'épreuve. Le matériau antigénique de l'extrait salin était un vaccin efficace pour le traitement et l'immunisation de la schistosomiase et d'autres infections par schistosome.

L'action officielle susmentionnée se fondait sur deux articles des inventeurs et a été utilisée ici en tant que principe de la présente invention. Parmi la masse de données qui correspondent aux données de base de la présente invention, les données les plus récentes étaient le clonage et le séquençage d'un constituant dérivé de SE, identifié comme Sm14.

L'étude la plus récemment publiée est "A 14-kDa *Schistosoma mansoni* Polypeptide is Homologous to a gene family of fatty Acid Binding Proteins (Un polypeptide de *Schistosoma mansoni* de 14 kDa est homologue à une famille génétique de protéines se liant à des acides gras) - *The Journal of Biological Chemistry* - vol. 266, n° 13, publication du 5 mai, pp. 8477 à 8454, 1991 ; D. Moser, M. Tendler, G. Griffiths, et Mo-Quen Klinkert". Cette étude décrit le séquençage du gène et la démonstration de l'activité fonctionnelle de la Sm14

en tant que protéine qui lie des lipides à la structure de la Sm14.

La séquence complète des nucléotides codant pour une protéine de *Schistosoma mansoni*, dénommée Sm14, a été déterminée à partir des clones d'ADNc propagés dans le bactériophage λgt 11 dans *Escherichia coli*. La protéine de 14,8 kDa comporte des homologies significatives avec une famille de polypeptides apparentés qui se lient à des ligands hydrophobes. Des éléments de ce groupe de protéines cytosoliques ont été à l'origine identifiés sur la base de leur affinité pour les acides gras à chaîne longue. La protéine recombinante purifiée présentait une affinité pour les acides gras, à la différence d'un mutant manquant de 16 acides aminés à extrémités N-terminales. La séquence complète des nucléotides peut être décrite comme un cadre de lecture ouvert commençant au triplet d'initiation ATG positionné aux nucléotides 123 à 125. La région codante comprend 399 nucléotides, terminant à la position 521. La protéine de 133 résidus acide aminé a une masse moléculaire de 14,847 kDa, calculée sur la base de la séquence.

La Sm14 est caractérisé en ce qu'elle présente la séquence d'acides aminés suivante :

MET-SER-SER-PHE-LEU-GLY-LYS-TRP-LYS-LEU-SER-GLU-SER-HIS-ASN-PHE-ASP-ALA-VAL-MET-SER-LYS-LEU-GLY-VAL-SER-TRP-ALA-THR-ARG-GLN-ILE-GLY-ASN-THR-VAL-THR-PRO-THR-VAL-THR-PHE-THR-MET-ASP-GLY-ASP-LYS-MET-THR-MET-LEU-THR-GLU-SER-THR-PHE-LYS-ASN-LEU-SER-CYS-THR-PHE-LYS-PHE-GLY-GLU-GLU-PHE-ASP-GLU-LYS-THR-SER-ASP-GLY-ARG-ASN-VAL-LYS-SER-VAL-VAL-GLU-LYS-ASN-SER-GLU-SER-LYS-LEU-THR-GLN-THR-GLN-VAL-ASP-PRO-LYS-ASN-THR-THR-VAL-ILE-VAL-ARG-GLU-VAL-ASP-GLY-ASP-THR-MET-LYS-THR-THR-

VAL-THR-VAL-GLY-ASP-VAL-THR-ALA-ILE-ARG-ASN-TYR-LYS-ARG-LEU-SER

En plus, Moser, D *et al.* décrivent qu'il serait désirable d'évaluer quel rôle joue la Sm14 dans le mélange protéique pour conférer une immunité à des animaux expérimentaux et de savoir si elle serait un antigène approprié pour une attaque immunologique efficace sur le parasite.

Perez, J.R. *et al.*, *Journal of Experimental Parasitology,* vol. 74 : n° 4, juin 1992, décrivent que le polypeptide qui agit par une réaction croisée avec l'antisérum contre l'antigène Fh12 immunoprophylactique partage une homologie significative de la séquence des acides aminés avec une protéine de *S. mansoni* de 14,8 kDA se liant à des acides gras, dénommée Sm14 (Moser *et al.*, 1991). En plus, il est décrit que le Fh12 est un puissant immunogène et une molécule immuno-prophylactique candidate pour la prévention tant de la schistosomiase que de la fasciolase (Hillyer 1985 ; Hillyer *et al.*, 1987), ainsi qu'un utile marqueur immunodiagnostique dans la fasciolase humaine (Hillyer *et al.*, 1992), et que les auteurs poursuivaient la production de préparations antigéniques recombinantes contenant des sous-groupes épitopes de Fh15 et une combinaison de sous-groupes, le Fh15 pourrait être la même protéine que le Fh12.

Néanmoins, même les travaux les plus apparentés (par Moser, D *et al.*, et Perez, J.R. *et al.*) à la présente invention n'ont pas évalué le rôle joué par la Sm14 dans le mélange protéique SE pour conférer une immunité à des animaux expérimentaux ni si elle serait un antigène protecteur efficace contre une infection par des schistosomes ou d'autres helminthes tels que *F. hepatica*.

La présente invention procède de la continuation de la recherche précédente publiée dans la mesure où elle prouve que la Sm14 est un constituant protecteur du SE extrêmement actif, capable de stimuler un taux élevé d'immunité protectrice sous une forme recombinante chez des animaux expérimentaux contre une infection soit par *S. mansoni* soit par *F. hepatica*.

L'objectif de la présente invention est la molécule de Sm14 définie comme antigène protecteur contre une infection helminthique.

Un autre objectif de l'invention est une forme recombinante de la Sm14, la rSm14.

Un autre objectif de l'invention est un vaccin contre l'infection provoquée par *Fasciola hepatica* chez les bovins, les ovins et les caprins.

Un autre objectif encore de l'invention est un vaccin contre l'infection provoquée par *Schistosoma mansoni* et toutes les autres espèces de *Schistosoma* qui sont responsables d'infections et de maladie chez les humains et les animaux.

Un autre objectif encore de l'invention est un vaccin contre l'infection causée par toutes les espèces d'helminthes d'intérêt médical et vétérinaire.

Un objectif supplémentaire de la présente invention est un réactif de diagnostic pour la schistosomiase et la fasciolase.

Ces objectifs peuvent être réalisés en fournissant un antigène pour conférer une immunité protectrice contre les helminthiases d'humains et d'animaux et le procédé de vaccination pour l'immunoprophylaxie de maladies helminthologiques d'intérêt médical et humain ainsi qu'en procurant un antigène pour agir en tant que réactif d'immunodiagnostic.

Selon la présente invention, l'antigène est constitué d'une protéine dérivée de *Schistosoma mansoni*, la Sm14, qui a la capacité de stimuler l'immunité protectrice dans les helminthiases d'animaux expérimentaux, en particulier *S. mansoni* et *F. hepatica*.

De plus, la présente invention comprend une forme recombinante de la Sm14, la rSm14, qui est une protéine de fusion avec la protéine de la capside du bactériophage T7.

La figure 1 montre un gel de la préparation antigénique finale (purification de la rSm14) en comparaison avec SF.

La figure 2 montre la structure tridimensionnelle de la Sm14 prévue par modélisation informatique.

La figure 3 montre l'évaluation du taux de protection de la rSm14 selon l'expérience 1.

La figure 4 montre l'évaluation du taux de protection de la rSm14 selon l'expérience 2.

La figure 5 montre l'évaluation du taux de protection de la rSm14 selon l'expérience 3.

La figure 6 montre l'évaluation du taux de protection de la rSm14 selon l'expérience 4.

La figure 7 montre les résultats mis en commun des expériences 1, 2, 3 et 4.

La figure 8 montre la vaccination de souris Swiss avec la rSm14 contre l'infection par *Fasciola hepatica*.

La figure 9 montre le foie d'un animal non vacciné qui a été infecté avec *Fasciola hepatica*.

La figure 10 montre aussi le foie d'un animal non vacciné qui a été infecté avec *Fasciola hepatica*.

La figure 11 montre le foie d'un animal vacciné qui a été infecté avec *Fasciola hepatica*.

Le procédé pour développer un vaccin contre l'espèce *Schistosoma* humaine en utilisant le même antigène vaccinant dans l'immunoprophylaxie de maladies provoquées par des espèces de parasites différentes qui affectent les humains et divers animaux peut être décrit par les étapes suivantes :

- réalisation de l'isolement d'un antigène commun à réaction croisée (qui, selon le mode de réalisation préféré de la présente invention, est la Sm14) qui est très protecteur à la fois contre les maladies d'animaux et celles d'humains ;
- test de cet antigène sous forme de vaccin pour l'immunoprophylaxie de la maladie d'animaux chez des hôtes expérimentaux et définis pour le parasite qui provoque l'infection et/ou la maladie ;
- analyse des renseignements dérivés de la vaccination de l'hôte animal, à savoir des ruminants domestiques, en se concentrant sur toutes les questions et conditions préalables apparentées pour le développement final d'un vaccin contre une maladie humaine donnée, telles que la toxicologie et la pathologie.

En utilisant le procédé selon la présente invention, il est possible de trouver un antigène qui est simultanément très efficace en tant que vaccin contre deux maladies parasitaires, tant des animaux domestiques que des humains. Selon le mode de réalisation préféré de la présente invention, les maladies parasitaires tant des animaux domestiques que des humains sont la fasciolase et la schistosomiase, respectivement, ainsi que d'autres maladies helminthiques qui affectent spécifiquement les humains et différentes espèces animales.

L'un des antigènes dans le mélange SE complexe, la Sm14, a été cloné et présente une homologie significative avec les protéines se liant à des acides gras et aussi avec le Fh15, un antigène de *Fasciola hepatica*. Cet antigène à réaction croisée, à savoir la Sm14, dans sa forme recombinante, la rSm14, confère une immunité protectrice à la fois contre la schistosomiase ainsi que contre la fasciolase.

La rSm14 est une protéine de fusion entre les 260 premiers acides aminés de la protéine de la capside du bactériophage T7 et le polypeptide Sm14 complet tel que défini ci-dessus, obtenue en créant un pont entre le 260^{e} résidu de la protéine du T7 et la méthionine initiale (MET) de la Sm14 avec la séquence d'acides aminés qui suit :

Résidu 260 de la protéine de la capside-LEU-LEU-THR-LEU-THR-LYS-GLY-LYS-ALA-LYS-SER-ALA-GLU-LEU-GLU-PHE-VAL-ASP-LEU-GLU-GLY-SER-VAL-Sm14.

Nous démontrerons ici la capacité d'une forme recombinante de la Sm14 à conférer une haute protection contre *Fasciola hepatica, Schistosoma mansoni,* ainsi que contre d'autres espèces de *Schistosoma et d'Echeinococcus* et, de façon supposée, d'autres helminthes qui sont pathogènes pour l'homme et l'animal. Les taux de protection obtenus par la vaccination expérimentale de centaines d'animaux montrent que la Sm14 est une molécule protectrice majeure dérivée du SE et qu'elle est le candidat tant pour le vaccin anti-*Schistosoma* que pour le vaccin anti-*Fasciola*.

La présente invention est maintenant décrite, de façon non limitative, par les exemples.

EXEMPLE 1

Le mode opératoire pour obtenir, caractériser et purifier la Sm14 recombinante est décrit ci-dessous :

phase 1 :

La transition de l'extrait salin protecteur (SE) en vaccin moléculaire a été effectuée comme suit :

a) la LE, une souche brésilienne du répertoire d'ADNc γgt 11 de *S. mansoni* (préparée à partir de vers adultes de la souche endémique LE de *Schistosoma mansoni*) a été criblée ou sélectionnée avec un sérum immun anti-SE dérivé d'individus totalement protégés (à savoir des lapins et du sérum de lapin "haute protection" tel que décrit auparavant dans ce document).

b) une espèce de clone d'ADNc reconnue par le sérum anti-SE haute protection de lapin qui fournit des signaux très intenses a été choisie parmi d'autres.

c) la séquence et la caractérisation ont révélé la protéine de 14 kDa dénommée Sm14 (la séquence des nucléotides et la séquence déduite des acides aminés est le travail déjà publié de Moser, Tendler *et al.*).

Un exemple pratique de la façon de réaliser la production du clone d'ADNc est décrite dans l'état de la technique.

phase 2 :

Expression de la Sm14 dans un système vecteur efficace

Le procédé pour conduire cela jusqu'au PDS-14 est décrit dans l'état de la technique (A 14-kDa *Schistosoma mansoni* Polypeptide is Homologous to a gene family of fatty Acid Binding Proteins (Un polypeptide de *Schistosoma mansoni* de 14 kDa est homologue à une famille génétique de protéines se liant à des acides gras) - *The Journal of Biological Chemistry* - vol. 266, n° 13, publication du 5 mai, pp. 8447 à 8454, 1991)

ainsi que l'identification et les résultats de la séquence d'ADNc clonée et est incorporé ici à titre de référence.

L'antisérum produit chez des lapins immunisés avec l'extrait de schistosome a été utilisé pour cribler le répertoire d'ADNc de *S. mansoni* adulte (décrit auparavant). Un clone, désigné Sm14, a été purifié en plaque après trois passages d'immunocriblage. Le phage recombinant a été lysogénéisé dans *E. coli* Y1089 et forcé d'exprimer une protéine de fusion bêtagalactosidase-Sm14 de 122 kDa. La protéine a été purifiée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE) préparatrice, et les anticorps contre la protéine de fusion ont été produits chez un lapin.

Le sous-clonage de la Sm14 et son expression dans le présent vecteur dans lequel les essais de vaccination contre *Schistosoma* et *Fasciola* ont été réalisés sont décrits ci-dessous :

Exciser le cadre de lecture ouvert entier codant pour la Sm14 du produit d'assemblage pDS-Sm14 par clivage avec Bam III et Hind III.

Le fragment obtenu a été soudé dans pGEMEX-I (Promega) clivé avec les mêmes enzymes.

phase 3 :

Le produit d'assemblage obtenu qui, à son tour, a abouti à ce que le gène soit dans le cadre pour l'expression sous la forme d'une protéine de fusion avec la protéine du gène 10 de T7, sous le contrôle d'un promoteur de l'ARN polymérase du T7, a été utilisé pour transformer la souche BL21 (DE3) d'*E. coli* qui contient le gène pour de l'ARN polymérase du T7 sous le contrôle d'UV Iac La souche BL 21 (DE3) d'*E. coli* a été utilisée pour l'expression de la protéine recombinante.

Sinon, on peut utiliser d'autres souches d'*E. coli* pour le même objectif, ainsi que d'autres systèmes d'expression, par exemple le PDS-14 comme déjà utilisé dans l'état de la technique.

phase 4 :

Des colonies contenant le plasmide recombinant ont été développées pendant une nuit, et l'expression de l'ARN polymérase du T7 a été provoquée par l'addition d'IPTG (isopropylthio-ß-D-galactoside) durant le développement subséquent en phase logarithmique.

Ce mode opératoire a abouti à l'expression d'une protéine de fusion avec un poids moléculaire prévu de 40 kDa (14 kDa de la Sm14 et 26 kDa de la protéine du gène 10).

phase 5 :

Les cellules bactériennes ont été recueillies par centrifugation (5000 tr/min./10 min.) et remises en suspension dans un tampon de lyse (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, EDTA 2 mM, DTT 1 mM, 2mg/ml de lysozyme) et incubées sur de la glace pendant 15 minutes. Les lysats ont ensuite été passés aux ultrasons pendant deux cycles de 30 secondes et recentrifugés. Le granule a été remis en suspension dans un tampon de lavage (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, EDTA 10 mM, DTT 1 mM, 0,5 % de Triton x-100) et centrifugé.

phase 6 :

Après un autre passage de remise en suspension et de centrifugation, le granule final a été remis en suspension dans de l'eau. Une SDS-PAGE a ensuite été effectuée, l'antigène a été purifié par électro-élution et stocké à des températures allant de -70 °C à -200 °C jusqu'à utilisation.

La figure 1 montre le degré de pureté de la rSm14 et la haute efficacité de l'expression.

L'analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide des antigènes totaux de SE de *S. mansoni* et de la Sm14 purifiée a été transcrite sur du papier de nitrocellulose. Les colonnes 1-3, SE et Sm14, séparées dans une SDS-PAGE à 10 et 15 % se sont respectivement colorées en bleu C. Colonnes 2 et 4, immunoblot. La colonne 2 a été sondée avec un antisérum polyclonal d'un lapin immunisé avec SE. Colonne 4, antisérum de protéine de fusion anti-Sm14 de lapin. Des marqueurs moléculaires faibles standards sont présentés des deux côtés de la figure.

La référence suivante à la figure 2 présente la structure tridimensionnelle de la Sm14.

La modélisation informatique de la structure de la Sm14 selon la présente invention est effectuée sur la base de la forte homologie connue de la Sm14 avec des protéines pour lesquelles la structure cristalline a déjà été déterminée. Cela donne une structure tridimensionnelle détaillée et fiable de la Sm14 à modéliser par modélisation informatique.

La structure tridimensionnelle décrit que : (1) la Sm14 est une protéine en forme de tambour, (2) l'acide gras se lie dans le tambour ; (3) le tambour est formé par dix feuilles pliées en bêta ; (4) les feuilles sont jointes par de courtes boucles ; (5) les boucles présentent une divergence entre les éléments de la famille des protéines se liant à des acides gras et sont responsables de l'antigénicité de la Sm14.

EXEMPLE 2

L'exemple 2 inclut les expériences 1 à 4. Les protocoles des expériences 1 à 4 ont été effectués comme décrit ci-dessous, et ils montrent l'activité protectrice du SE et de la rSm14 chez la souris Swiss.

Les protocoles d'immunisation avec SE (300 µg/ml par dose/animal) et la protéine de fusion rSm14 (10 µg/ml/dose) ont été effectués avec le protocole d'immunisation suivant, qui est constitué de deux doses de l'antigène, avec ou sans adjuvant de Freund, données à des souris naïves à intervalles de sept jours par injection sous-cutanée, suivie d'une dose rappel 21 jours après la seconde dose. On peut faire varier les intervalles entre l'application des doses vaccinantes. Après un intervalle de 60 jours (qu'on peut aussi faire varier, par exemple 45 jours) les animaux ont été mis à l'épreuve avec 100 cercaires.

La protection globale pour chaque groupe d'animaux (animaux immunisés/mis à l'épreuve et témoins respectifs) a été calculée comme suit :

$$(C - V)/C \times 100$$

où C = parasites récupérés des témoins ; et V = parasites récupérés des animaux vaccinés.

Les résultats sont présentés au tableau 1.

Différents groupes témoins caractérisés par des souris SW appariées quant au sexe et à l'âge simultanément mises à l'épreuve avec le même nombre et le même groupe de cercaires *S. mansoni*, ont été utilisés en tant que témoins d'infection pour chaque expérience individuelle. Ces animaux ont reçu seulement des injections parallèles de STP (solution saline de tampon phosphate). Des groupes témoins supplémentaires pour la protéine de fusion (gène 10) et l'adjuvant (adjuvant complet de Freund) ont aussi été inclus.

Dans l'expérience 1, l'activité protectrice de la Sm14 avec ou sans adjuvant complet de Freund (FCA) a été analysée en parallèle à l'activité de la protéine du gène 10, comme le montre le tableau II. Les charges moyennes de vers récupérées des souris vaccinées avec

la protéine du gène 10 purifiée, avec ou sans FCA, étaient pratiquement les mêmes que la charge de vers récoltée d'animaux du groupe témoin au STP.

Dans l'expérience 2, l'activité protectrice induite par la rSm14 et la rSm14 avec du FCA a été testée en comparaison avec la vaccination avec le SE (avec ou sans FCA).

Les expériences 3 et 4 ont été conçues pour tester l'activité du FCA seul et la reproductibilité de l'activité protectrice induite par vaccination avec la rSm14.

Dans toutes les expériences, la forte capacité de la rSm14 à induire des taux significativement élevés de protection immunitaire contre une infection encore mise à l'épreuve de souris avec *S. mansoni* est démontrée de façon conclusive.

L'analyse statistique des données présentées montre que la charge de vers récupérée des groupes vaccinés est significativement plus basse ($p < 0,05$) que le nombre moyen de parasites abrités d'un animal infecté non vacciné.

EXEMPLE 3

Cet exemple montre une activité protectrice du SE et de la rSm14 chez des lapins.

Les protocoles d'immunisation sont les mêmes que ceux utilisés chez les souris Swiss dans l'exemple 2. Les quantités de dose/animal sont indiquées au tableau II. Les lapins ont été mis à l'épreuve avec 1000 cercaires (au lieu de 100 comme dans l'exemple 2).

Le tableau II montre la capacité de la rSm14 à induire des taux significativement élevés d'immuno-protection contre l'infection d'épreuve de lapins avec *S. mansoni*.

En outre, cet exemple éclaire l'activité de la rSm14 en tant qu'antigène isolé par rapport au mélange de SE.

Les résultats sont présentés au tableau II.

EXEMPLE 4

Cet exemple démontre les expériences 1 à 4 de l'exemple 2 (ce qui signifie qu'on a utilisé les mêmes protocoles d'immunisation), mais avec une méthodologie différente pour évaluer la protection.

Cette méthodologie se fonde sur l'établissement d'une résistance induite par le vaccin, au moyen d'une analyse de population des fréquences de charges de vers au travers de la distribution des charges de vers dans une série de gammes de parasites.

Les résultats sont présentés au tableau III.

Selon le tableau III, la protéine de fusion Sm14 recombinante purifiée a stimulé un taux de protection qui n'était pas significativement différent de celui du SE intact, jugé par les taux moyens de charge de vers (tableau I). Les taux de protection obtenus avec le SE correspondent aux résultats publiés auparavant. Est d'un intérêt particulier le fait qu'un taux de protection semblable est obtenu avec ou sans adjuvant, ce qui est en faveur de l'utilisation de l'antigène chez l'homme. En plus, le fait que nous ayons protégé avec succès des groupes de souris Swiss entrecroisées avec l'antigène montre que la restriction génétique du système immunitaire n'aboutit pas à des variations grossières de la réaction de protection.

Comme le montre le tableau III, on a observé des séquences complètement différentes de distribution des charges de vers chez les groupes vaccinés par rapport aux groupes non vaccinés. Ce qui frappe tout particulièrement, c'est la différence du nombre de

souris dans le groupe avec 0 à 10 vers. Après une infection d'épreuve de 100 cercaires/souris, aucune des souris non vaccinées n'a eu de taux d'infection dans cette gamme et le pic de fréquence (60 %) pour les animaux infectés (non vaccinés) était dans la gamme de 21 à 30 vers. En revanche, le pic de fréquence (64,5 %) pour les souris vaccinées soit avec SE soit avec rSm14 est tombé dans la gamme de 0 à 10 vers/souris.

Comme on le voit, selon la présente invention, il est d'un intérêt particulier que pratiquement la totalité de l'effet protecteur du mélange complexe SE peut être reproduite avec cet unique antigène. Les essais avec d'autres antigènes définis dérivés de SE (glutathione-S-transférase et paramysine) n'ont pas abouti au même taux élevé de protection. Comme mentionné ci-dessus, la Sm14 a aussi un degré significatif d'homologie avec diverses protéines se liant à des acides gras.

Les résultats, présentés au tableau III, des expériences 1 à 4, sont démontrés graphiquement aux figures 3 à 6.

Les figures 3 à 6 correspondent aux expériences 1 à 4. Dans ces figures, il est possible d'évaluer la protection par l'analyse des profils de population de la charge de vers des groupes vaccinés par rapport aux groupes non vaccinés.

La figure 7 présente les résultats mis en commun.

EXEMPLE 5

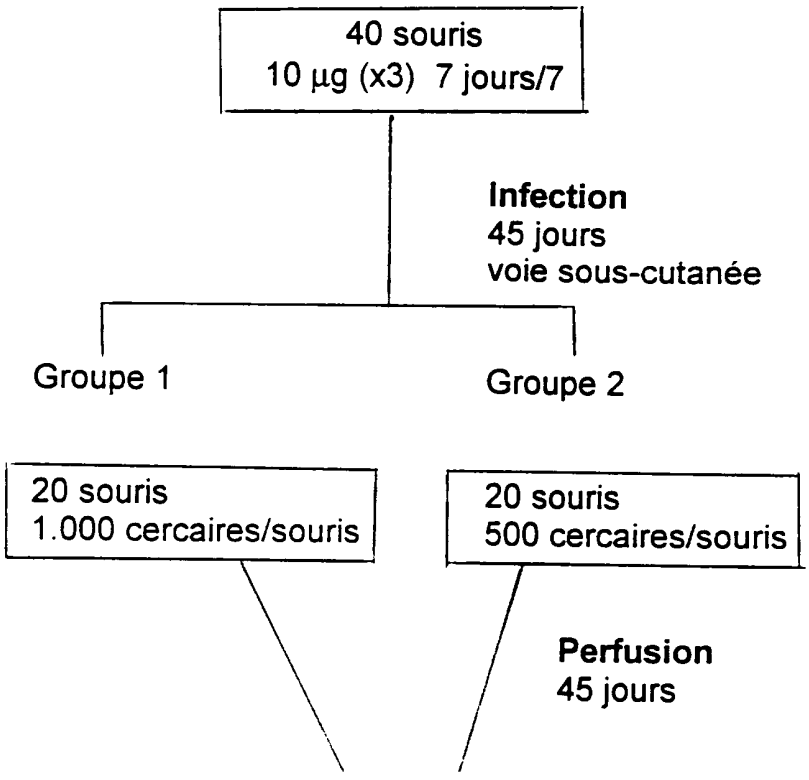
Dans cet exemple, des souris vaccinées ont été mises à l'épreuve avec 500 et 1000 cercaires/animal ou ont été mises à l'épreuve 2 ou 3 fois (100 cercaires/-animal/infection) avec un intervalle d'une semaine entre chaque. Comme on le constate, on fait varier la taille et le nombre d'infections d'épreuve.

La protection induite par trois dose de 10 µg de protéine (rSm14) injectées reste supérieure à 50 % contre une infection d'épreuve unique de 500 ou 1000 cercaires/animal. Le même effet est observé lorsque l'infection d'épreuve avec 100 cercaires/animal est répétée deux ou trois fois en gardant une semaine d'intervalle entre chaque épreuve.

Les protocoles pour cet exemple sont les suivants :

Protocole de Vaccination

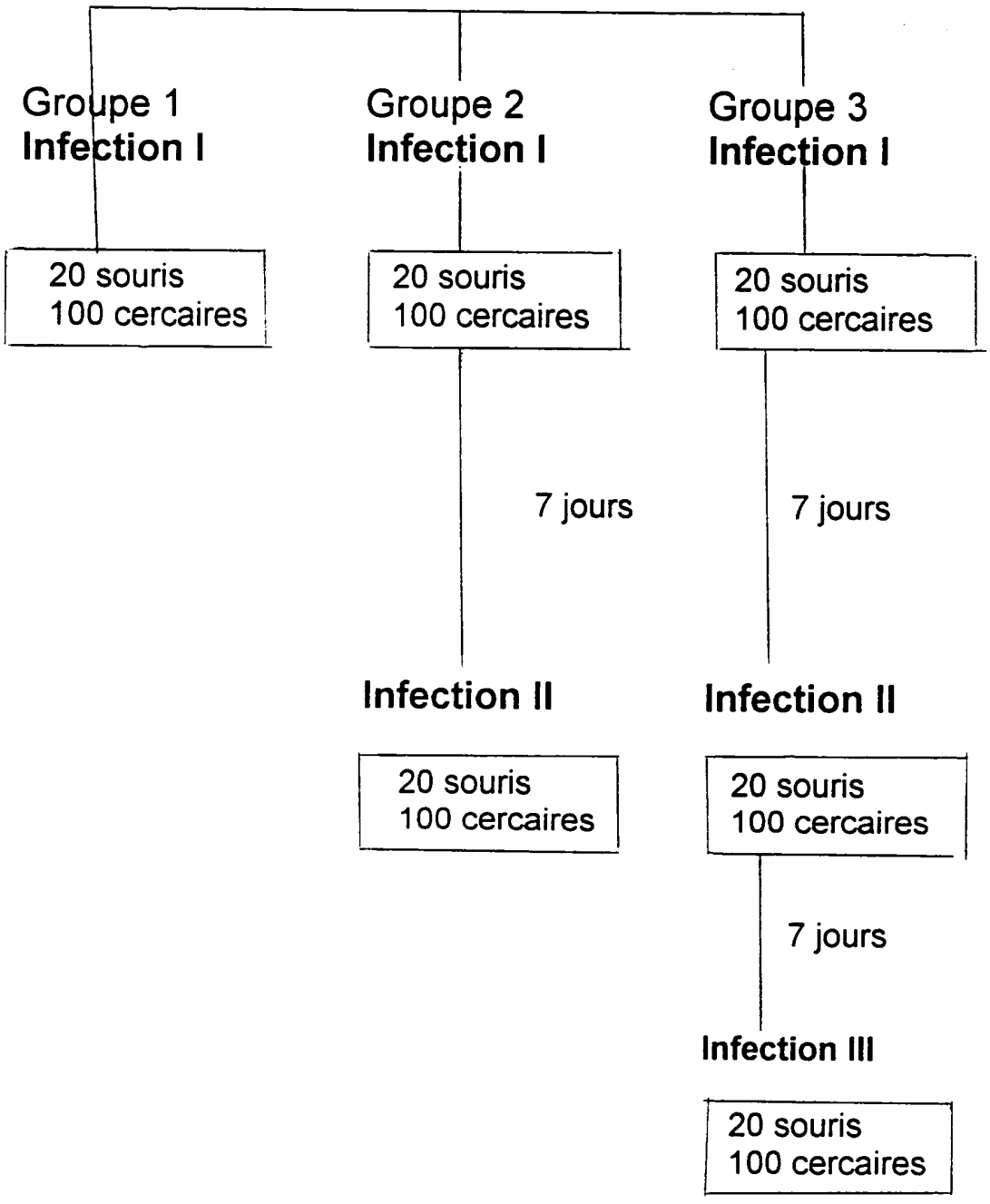
rSm 14 + FCA



Evaluation de la charge de vers
groupe 1 et 2

Protocole de Vaccination

rSm 14 + FCA



Les données de l'exemple 5 sont résumées aux tableaux IV et V, respectivement.

EXEMPLE 6

Pour démontrer la réactivité des sérums de patients souffrant de schistosomiase contre une protéine se liant à des acides gras de *Schistosoma mansoni*, la rSm14, l'exemple est réalisé comme suit.

Les sérums de patients humains d'une zone brésilienne endémique et des sérums de jeunes hommes vivant hors de la zone endémique sont testés par immunoblotting contre l'antigène Sm14 recombinant. Les patients sont classés en groupes selon la forme clinique et le nombre d'oeufs compté. Le diagnostic parasitologique est obtenu par le procédé de Kato-Katz.

Les résultats montrent que les sérums de tous les individus infectés reconnaissaient la rSm14 lors de l'immunoblotting, indépendamment de l'âge, de la charge de vers ou de la forme clinique, reflétant ainsi l'immunogénicité de la rSm14.

EXEMPLE 7

Cet exemple montre la vaccination de souris Swiss avec de la rSm14 contre une infection avec *Fasciola hepatica* et la protection complète obtenue contre la fasciolase.

L'exemple 7 est réalisé comme suit.

Deux groupes de 15 souris ont été immunisés avec de la rSm14 ou sans adjuvant. Le protocole de vaccination est : (a) deux injections hebdomadaires d'antigène (10 µg de rSm14/dose/animal) émulsionné ou non dans du FCA (adjuvant) ; (b) application d'une nouvelle dose d'injections d'antigène trois semaines plus tard ; (c) quarante-cinq jours après la troisième dose, ils ont été mis à l'épreuve avec trois

métacercaires *Fasciola hepatica* et sacrifiés trente jours après l'infection.

Cet exemple montre des antigènes protecteurs à réaction croisée entre différents helminthes tels que les schistosomes et *Fasciola hepatica*.

Il a été récemment décrit qu'un antigène nommé FSh15, cloné du parasite apparenté, la douve du foie *Fasciola hepatica,* a un degré significatif d'homologie au niveau de la séquence prévue des acides aminés avec la Sm14 et qu'il présente des résultats montrant que la Sm14 est l'homologue de cette protéine dans *Fasciola hepatica*.

La Sm14 recombinante a ainsi été testée en tant qu'antigène vaccinant contre l'infection par *Fasciola hepatica* tel que décrit dans cet exemple.

Les références aux figures 9, 10 et 11 suivent, montrant le foie d'animaux non vaccinés (figures 9 et 10) par rapport à des animaux vaccinés (figure 11).

Après le test parasitologique pour évaluer l'infection par *Fasciola hepatica* des animaux vaccinés avec la rSm14 et des animaux non vaccinés (témoins), soumis à la même infection avec trois métacercaires/-souris, le foie, les intestins et d'autres organes ont été examinés par des procédés histologiques classiques pour évaluer la pathologie qui s'était développée chez les animaux des deux groupes. Il convient de remarquer que principalement le foie et les intestins sont les organes les plus affectés par *Fasciola hepatica* et, par conséquent, ils ont été examinés de façon approfondie.

Ainsi, trente jours après l'infection orale par le procédé classique avec trois métacercaires de *Fasciola hepatica* par souris, les animaux ont été sacrifiés pour une évaluation de la charge d'infection acquise en présence de la vaccination précédente avec la rSm14 par

rapport aux animaux non vaccinés. Les organes ont été fixés dans une solution de Millon, découpés, colorés par la technique hématoxyline-éosine, et examinés au microscope optique.

Il est démontré de façon conclusive, au moyen des figures 8, 9, 10 et 11, que la rSm14 est capable d'induire une protection contre l'infection par *Fasciola hepatica* sur la base des données parasitologiques et anatomo-pathologiques. Parmi les animaux vaccinés avec la rSm14, pratiquement aucun individu n'a acquis l'infection, après exposition à trois métacercaires (dose maximale autorisée pour les souris) de *Fasciola hepatica*. En revanche, tous les animaux témoins non vaccinés sont devenus infectés après la même exposition.

Du point de vue anatomo-pathologique, le parenchyme du foie de tous les individus qui ont été vaccinés avec la rSm14 n'a pas présenté une quelconque altération liée à l'infection par *Fasciola hepatica*, mis à part de petites zones fibrotiques au niveau de la capsule de Glisson. Cette découverte montre que les parasites d'épreuve sont tués par l'effet de la vaccination très tôt dans leur cycle de vie chez l'hôte vertébré. En revanche, tous les animaux non vaccinés/infectés ont présenté des zones extensives de destruction des hépatocytes avec de sévères régions hémorragiques qui s'étendaient jusqu'à la capsule de Glisson.

Comme le montrent les figures 9 et 10, une destruction extensive du parenchyme a été observée, avec la présence des parasites adultes chez plusieurs individus.

Tableau I

Activité protectrice de SE et de rSm 14 chez des souris swiss

immunisation antigène (3 doses)	nombre de souris	charge de vers	protection %
Exp 1.: 10 µg rSm 14 + FCA	20	12.1	50.6
10 µg rSm 14	19	9.9	59.6
10 µg Gene 10 + FCA	22	28.4	0
10 µg Gene 10	22	27.7	0
PBS	12	24.5	0
Exp 2.: 300 µg SE + FCA	21	7.8	72.1
300 µg SE	20	12.9	53.9
10 µg rSm 14 + FCA	10	9.6	65.7
10 µg rSm 14	14	13.6	51.4
PBS	8	28.0	0
Exp 3.: 300 µg SE + FCA	11	11.6	56.7
300 µg FCA	10	25.9	0
10 µg rSm 14 + FCA	11	10.1	62.3
10 µg rSm 14	12	8.6	67.9
PBS	8	26.8	0
Exp 4.: 300 µg FCA	10	23.2	0
10 µg rSm 14 + FCA	9	10.1	64.0
10 µg rSm 14	9	12.5	55.3
PBS	7	28.0	0

Tableau II

Activité protectrice de SE et de rSm 14 chez des lapins (Nouvelle-Zélande)

Immunisation Antigène + FCA 3 doses	Nombre de lapins	X =sem	Protection (%)
600 µg SE + FCA	4	7.4 ± 3.9	93
80 µg rSm 14 + FCA	4	12.0 ± 4.1	89
Témoin	4	109.5 ± 11.0	-

Tableau III

Activité protectrice du rSm 14 chez des souris entrecroisées description de la fréquence des charges de vers

Expérience 1

Charges de vers	rSm14 + FCA	rSm 14	Gene 10 + FCA	Gene 10	Témoin (PBS)
0 - 10	65, 0	57, 9	-	-	-
11 - 20	20, 0	31, 6	4, 5	-	19, 7
21 - 30	15, 0	10, 5	59, 1	68, 2	61, 7
31 - 40	-	-	31, 8	27, 3	10, 5
41	-	-	4, 5	4, 5	8, 1
N = souris par groupe	20	19	22	22	88

Expérience 2

Charges de vers	SE + FCA	SE	rSm14 + FCA	rSm14	Témoin (PBS)
0 - 10	76, 2	40, 0	60, 0	35, 7	-
11 - 20	23, 8	55, 0	40, 0	64, 3	19, 7
21 - 30	-	5, 0	-	-	61, 7
31 - 40	-	-	-	-	10, 5
41	-	-	-	-	8, 1
N = souris par groupe	21	20	10	14	88

Expérience 3

Charges de vers	SE + FCA	FCA	rSm14 + FCA	rSm14	Témoin (PBS)
0 - 10	77, 8	-	63, 6	66, 7	-
11 - 20	11, 1	40, 0	36, 4	33, 3	19, 7
21 - 30	11, 1	30, 0	-	-	61, 7
31 - 40	-	30, 0	-	-	10, 5
41	-	-	-	-	8, 1
N = souris par groupe	9	10	11	12	88

Expérience 4

Charges de vers	FCA	rSm 14 + FCA	rSm14	Témoin (PBS)
0 - 10	-	44, 4	22, 2	-
11 - 20	40, 0	44, 4	77, 8	19, 7
21 - 30	30, 0	11, 2	-	61, 7
31 - 40	30, 0	-	-	10, 5
41	-	-	-	8, 1
N = souris par groupe	10	9	9	88

Tableau 4

Activité protectrice du rSm 14 chez des souris entrecroisées en fonction de la variation de l'infection d'épreuve

Vaccination avec rSm 14 + FCA contre différentes infections				
Groupes	Nombre de Soirs	Nombre de Cercaires/Souris	X ± erreur type de la moyenne (SEM)	Protection (%)
1	20	1.000	58 ± 13.2	65.9
Témoin	20	1.000	170 ± 15.0	-
2	20	500	31.5 ± 2.3	49.7
Témoin	20	500	62.6 ± 2.1	-

Schéma d' immunisation: doses x 3 : 10µg de rSm 14 + FCA à intervalles d'une semaine, infection d'epreuve, 45 jours apres la dernière dose de vaccination.

$P < 0,05$

2714065

Tableau 5

Activité protectrice du rSm 14 chez des souris entrecroisées en fonction d'infections d'épreuve multiples

Vaccination avec rSm14 + FCA contre différentes infections				
Groupes	Nombre de Souris	Nombre de Cercaires/Souris	X ± erreur type de la moyenne (SEM)	Protection (%)
1	20	100	11.2 ± 1.09	58.8
Témoin	20	100	27.2 ± 2.2	-
2	20	100 (x2)	33.0 ± 1.7	57.3
Témoin	20	100	52.6 ± 1.5	-
3	20	100 (x3)	42.3 ± 2.3	59.2
Témoin	20	100	47.3 ± 3.3	-

Schéma d'immunisation: doses x 3 : 10µg de rSm 14 + FCA d'une semaine, infection d'épreuve, 45 jours apres la dernière dose de vaccination

$P < 0,05$

2714065

REVENDICATIONS

1. Sm14 , protéine qui a un poids moléculaire entre 14 et 15 kDa, dérivée de *Schistosoma mansoni*, dans laquelle la séquence des acides aminés est MET-SER-SER-PHE-LEU-GLY-LYS-TRP-LYS-LEU-SER-GLU-SER-HIS-ASN-PHE-ASP-ALA-VAL-MET-SER-LYS-LEU-GLY-VAL-SER-TRP-ALA-THR-ARG-GLN-ILE-GLY-ASN-THR-VAL-THR-PRO-THR-VAL-THR-PHE-THR-MET-ASP-GLY-ASP-LYS-MET-THR-MET-LEU-THR-GLU-SER-THR-PHE-LYS-ASN-LEU-SER-CYS-THR-PHE-LYS-PHE-GLY-GLU-GLU-PHE-ASP-GLU-LYS-THR-SER-ASP-GLY-ARG-ASN-VAL-LYS-SER-VAL-VAL-GLU-LYS-ASN-SER-GLU-SER-LYS-LEU-THR-GLN-THR-GLN-VAL-ASP-PRO-LYS-ASN-THR-THR-VAL-ILE-VAL-ARG-GLU-VAL-ASP-GLY-ASP-THR-MET-LYS-THR-THR-VAL-THR-VAL-GLY-ASP-VAL-THR-ALA-ILE-ARG-ASN-TYR-LYS-ARG-LEU-SER- et qui a la capacité de se lier à des acides gras, caractérisée par son antigénicité protectrice contre des helminthiases, obtenue par vaccination avec jusqu'à 3 doses de 10 µg ou moins de la protéine sous forme native, recombinante ou synthétique, en présence ou absence d'adjuvant.

2. Sm14 selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite Sm14 est formée par une chaîne de polypeptides repliée en courtes boucles jointes par dix feuilles pliées en bêta, comme le montre la figure 2.

3. Sm14 selon la revendication 1, caractérisée par une antigénicité protectrice contre *Schistosoma mansoni* allant jusqu'à 67,9 % chez des souris Swiss entrecroisées, obtenue par vaccination avec 3 doses de 10 µg ou moins de la protéine sous forme native, recombinante ou synthétique, en l'absence d'adjuvant.

4. Sm14 selon la revendication 1, caractérisée par une antigénicité protectrice contre *Schistosoma mansoni* allant jusqu'à 72,1 % chez des souris Swiss entrecroisées, obtenue par vaccination avec 3 doses de 10 µg ou moins de la protéine sous forme native, recombinante ou synthétique, en présence d'un adjuvant complet de Freund.

5. Sm14 selon la revendication 1, caractérisée par une antigénicité protectrice contre *Schistosoma mansoni* allant jusqu'à 89 % chez des lapins de Nouvelle-Zélande, obtenue par vaccination avec 3 doses de 80 µg ou moins de la protéine sous forme native, recombinante ou synthétique, en présence d'un adjuvant complet de Freund.

6. Sm14 selon la revendication 1, caractérisée par une antigénicité protectrice contre *Fasciola hepatica*, obtenue par vaccination avec 3 doses de 10 µg ou moins de la protéine sous forme native, recombinante ou synthétique, en l'absence d'adjuvant.

7. rSm14, caractérisée en ce qu'elle est une protéine de fusion entre les 260 premiers acides aminés de la protéine de la capside du bactériophage T7 et le polypeptide Sm14 complet tel que défini dans la revendication 1, obtenue en reliant par un pont le 260^{e} résidu de la protéine T7 et la méthionine initiale (MET) de la Sm14 avec la séquence d'acides aminés suivante :
résidu 260 de la capside de la protéine-LEU-LEU-THR-LEU-THR-LYS-GLY-LYS-ALA-LYS-SER-ALA-GLU-LEU-GLU-PHE-VAL-ASP-LEU-GLU-GLY-SER-VAL-Sm14.

8. rSm14, caractérisée en ce qu'elle est telle que définie selon la revendication 7, dans laquelle la protéine T7 est remplacée par n'importe quelle autre protéine.

9. rSm14 selon la revendication 7 ou 8, caractérisée en ce qu'elle est obtenue par expression dans des micro-organismes et purification appropriée.

10. rSm14 selon la revendication 7 ou 8, caractérisée en ce qu'elle est obtenue par expression dans *Escherichia coli*.

11. rSm14 selon la revendication 10, caractérisée en ce que ladite rSm14 est obtenue en utilisant une souche *Escherichia coli* BL 21 (DE 3).

12. rSm14 selon les revendications 9 ou 10, caractérisée par une purification initiale de la protéine de fusion exprimée par passage aux ultrasons, lyse et centrifugation répétées et purification finale par électro-élution à partir de gels de SDS-PAGE.

13. rSm14 selon la revendication 7, caractérisée en ce qu'elle est obtenue par synthèse chimique de tout ou partie de la chaîne de polypeptides.

14. Utilisation de la Sm14, telle que définie dans la revendication 1, pour la préparation d'un vaccin contre les maladies provoquées par des helminthes.

15. Utilisation de la Sm14, telle que définie dans la revendication 1, pour la préparation d'un vaccin contre les maladies provoquées par *Fasciola hepatica*.

16. Utilisation de la Sm14, telle que définie dans la revendication 1, pour la préparation d'un vaccin contre les maladies provoquées par les schistosomes.

17. Utilisation de la Sm14, telle que définie dans la revendication 1, pour la préparation d'un vaccin contre les maladies provoquées par *Schistosoma mansoni*.

18. Utilisation de la rSm14, telle que définie dans la revendication 7 ou 8, pour la préparation d'un vaccin contre les maladies provoquées par des helminthes.

19. Utilisation de la rSm14, telle que définie dans la revendication 7 ou 8, pour la préparation d'un vaccin contre les maladies provoquées par *Fasciola hepatica*.

20. Utilisation de la rSm14, telle que définie dans la revendication 7 ou 8, pour la préparation d'un vaccin contre les maladies provoquées par les schistosomes.

21. Utilisation de la rSm14, telle que définie dans la revendication 7 ou 8, pour la préparation d'un vaccin contre les maladies provoquées par *Schistosoma mansoni*.

22. Utilisation de protéines de fusion recombinantes, caractérisée en ce qu'elles sont définies dans la revendication 6, où Sm14 est remplacée par n'importe quelle autre protéine, pour la préparation de vaccins humains et vétérinaires.

23. Utilisation de la Sm14, telle que définie dans la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est un

réactif de diagnostic pour la schistosomiase et la fasciolase.

24. Utilisation de la rSm14, telle que définie dans la revendication 7 ou 8, caractérisée en ce qu'elle est un réactif de diagnostic pour la schistosomiase et la fasciolase.

25. Procédé pour développer un vaccin vétérinaire pour les humains contre des maladies causées par des infections helminthiques, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- réalisation de l'isolement d'un antigène commun à réaction croisée, notamment la Sm14 selon la revendication 1, qui est protecteur à la fois contre les maladies causées par des infections helminthiques d'animaux et celles d'humains;
- test de l'antigène sous forme de vaccin pour l'immunoprophylaxie de la maladie d'animaux chez un animal hôte pour le parasite qui provoque l'infection et/ou la maladie;
- vérification du niveau de l'activité protectrice de l'antigène chez l'animal hôte;
- établissement de la corrélation entre l'activité protectrice de l'antigène commun à réaction croisée chez l'animal hôte et l'activité protectrice correspondante chez les humains.

GEL DE LA PREPARATION ANTIGENIQUE FINALE
(purification du rSm14) par rapport à SE

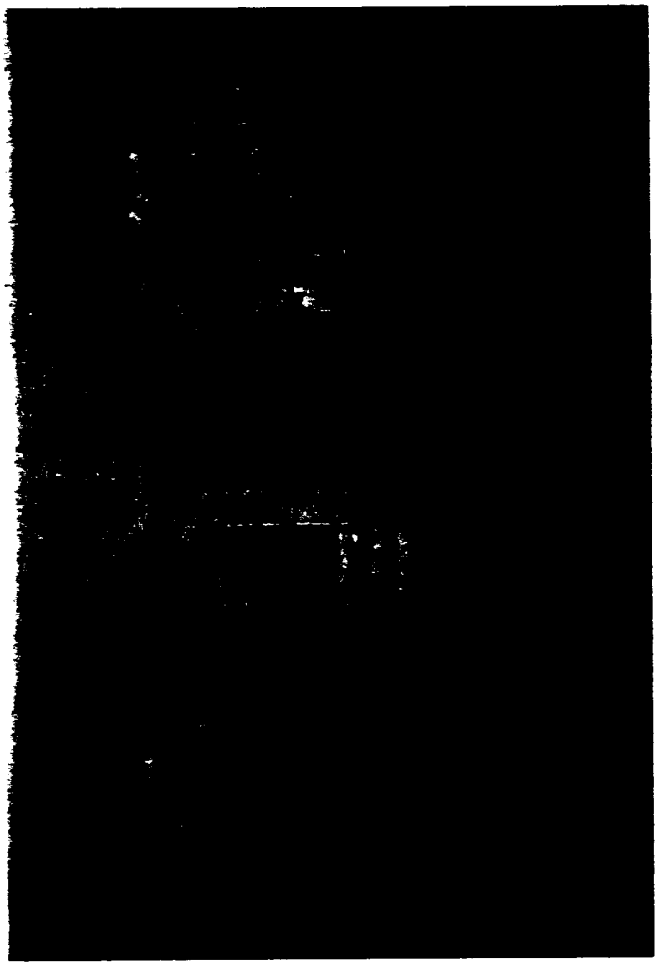


FIGURE 1

PREVISION DE LA STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE PAR MODELISATION INFORMATIQUE

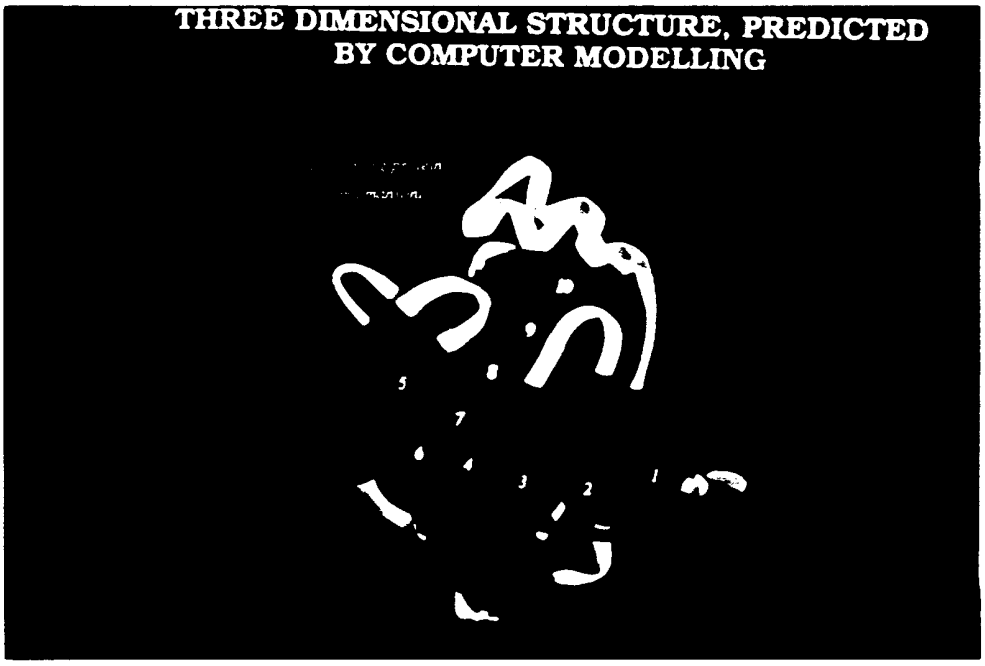


FIGURE 2

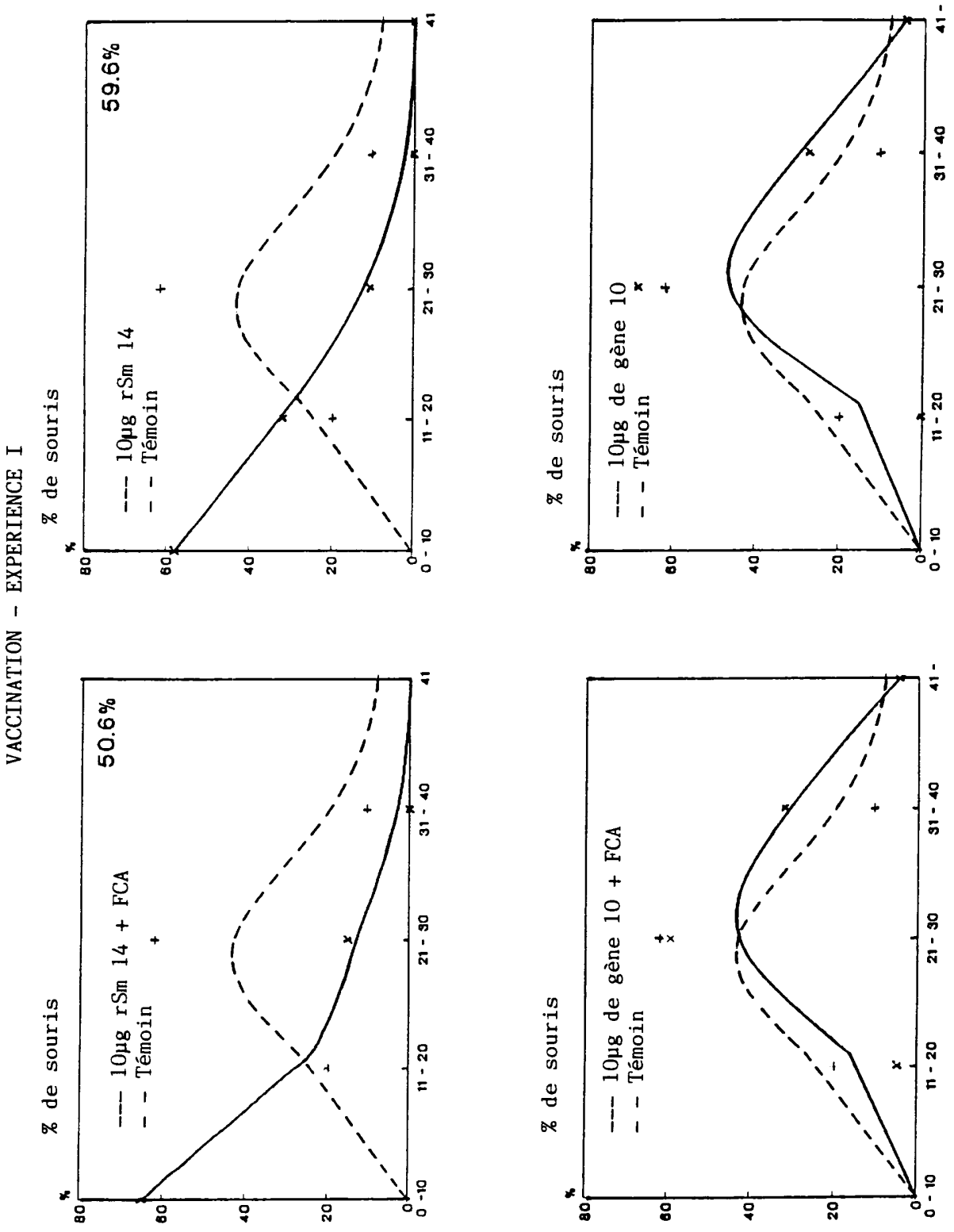

VACCINATION - EXPERIENCE I
% de souris
10µg rSm 14 + FCA
Témoin
50.6%
10µg rSm 14
Témoin
59.6%
10µg de gène 10
Témoin
10µg de gène 10 + FCA
Témoin
0 - 10
11 - 20
21 - 30
31 - 40
CHARGE DE VERS

FIGURE 3

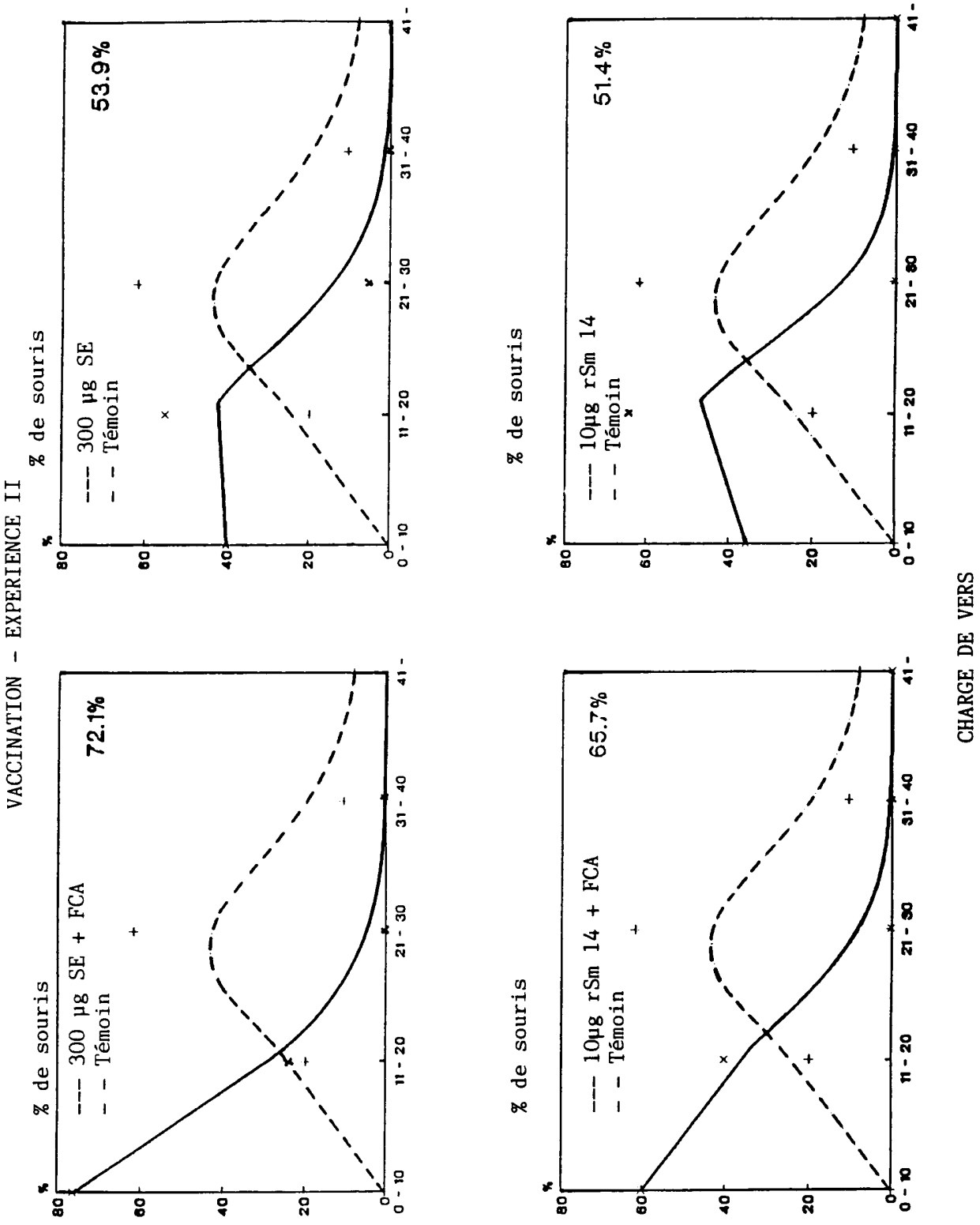

VACCINATION - EXPERIENCE II
% de souris
--- 300 µg SE + FCA
- - Témoin
72.1%
--- 300 µg SE
- - Témoin
53.9%
--- 10µg rSm 14 + FCA
- - Témoin
65.7%
--- 10µg rSm 14
- - Témoin
51.4%
0 - 10
11 - 20
21 - 30
31 - 40
41 -
CHARGE DE VERS

FIGURE 4

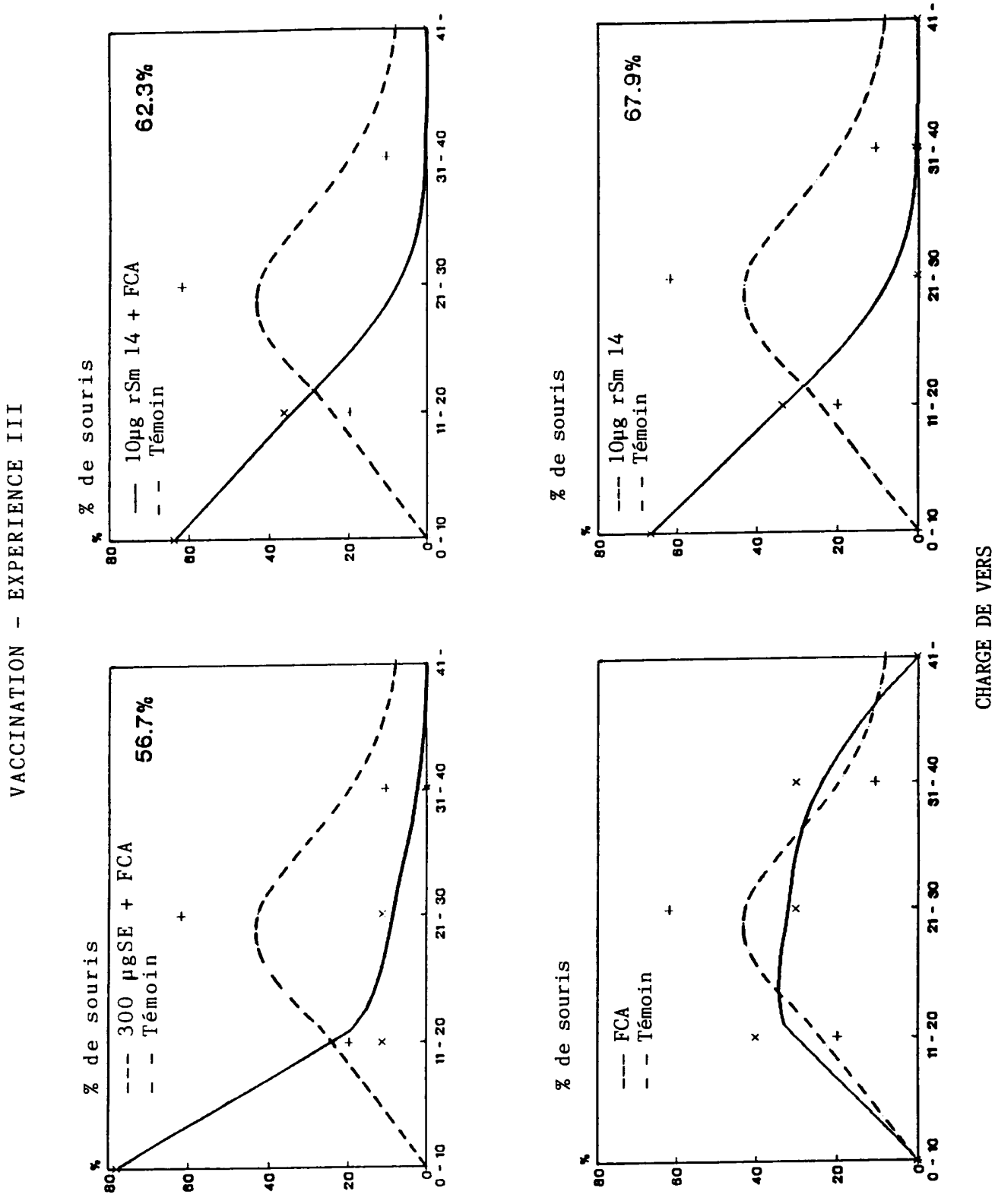

VACCINATION - EXPERIENCE III
% de souris
--- 300 µgSE + FCA
- - Témoin
56.7%
--- FCA
- - Témoin
--- 10µg rSm 14 + FCA
- - Témoin
62.3%
--- 10µg rSm 14
- - Témoin
67.9%
0 - 10
11 - 20
21 - 30
31 - 40
41 -
CHARGE DE VERS

FIGURE 5

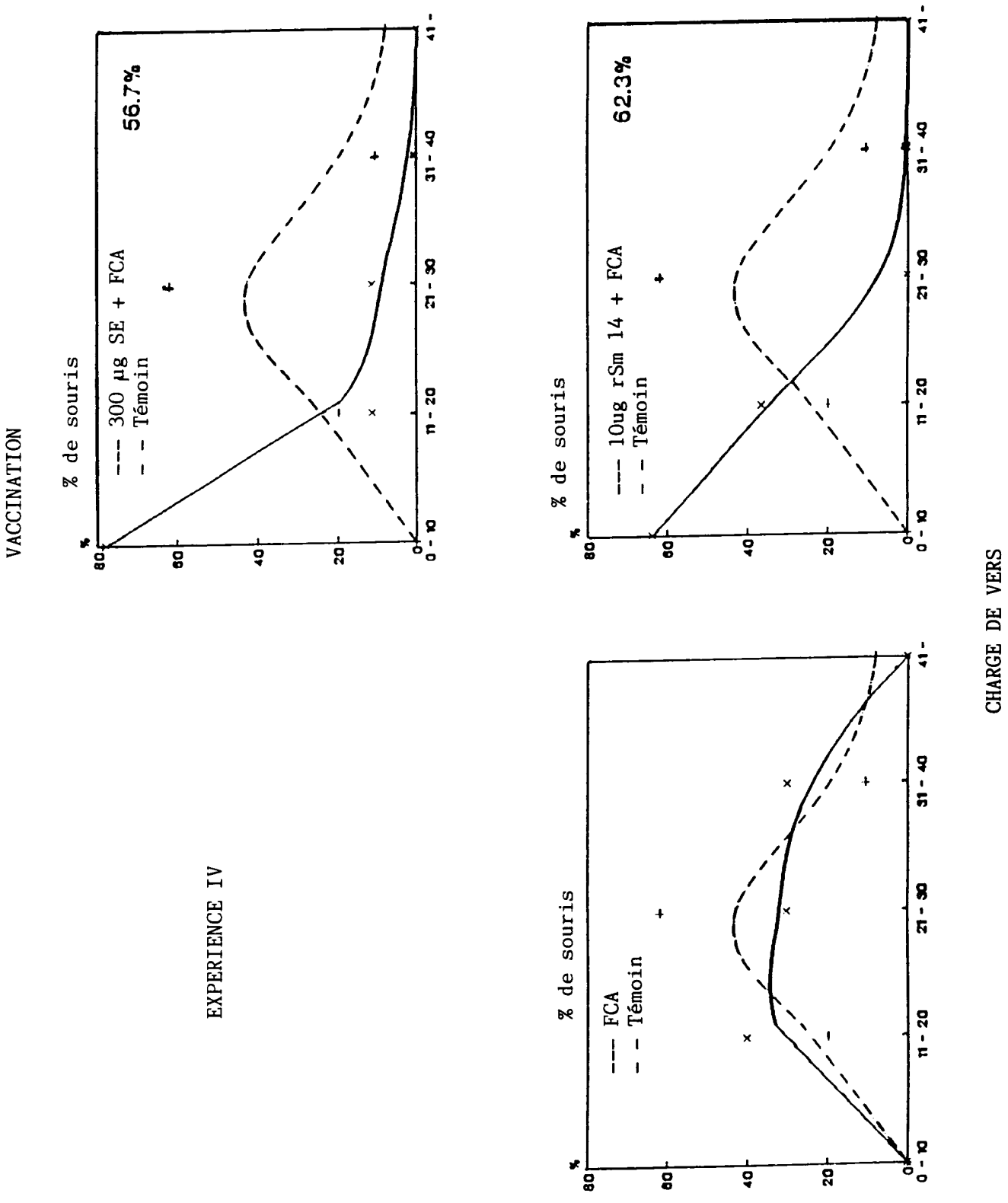
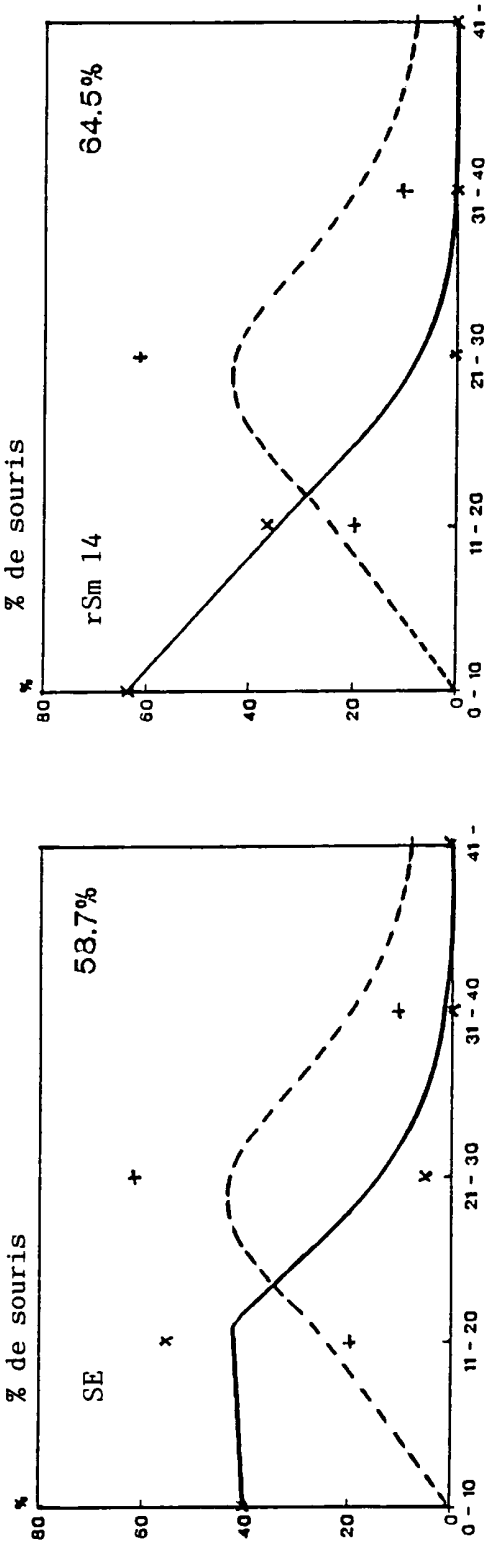

VACCINATION
% de souris
--- 300 µg SE + FCA
- - Témoin
56.7%
62.3%
--- 10ug rSm 14 + FCA
- - Témoin
--- FCA
- - Témoin
EXPERIENCE IV
CHARGE DE VERS
0 - 10
11 - 20
21 - 30
31 - 40
41 -
80
60
40
20
0

FIGURE 6

MISE EN COMMUN DES RESULTATS



. Protection avec rSm 14 ⩾ SE
. Protection sans adjuvant = protection avec adjuvant
. Taux de protection moyen pour le rSm 14 des souris entrecroisées = 65%

FIGURE 7

VACCINATION DE SOURIS SWISS AVEC rSm 14 CONTRE
L'INFECTION PAR FASCIOLA HEPATICA

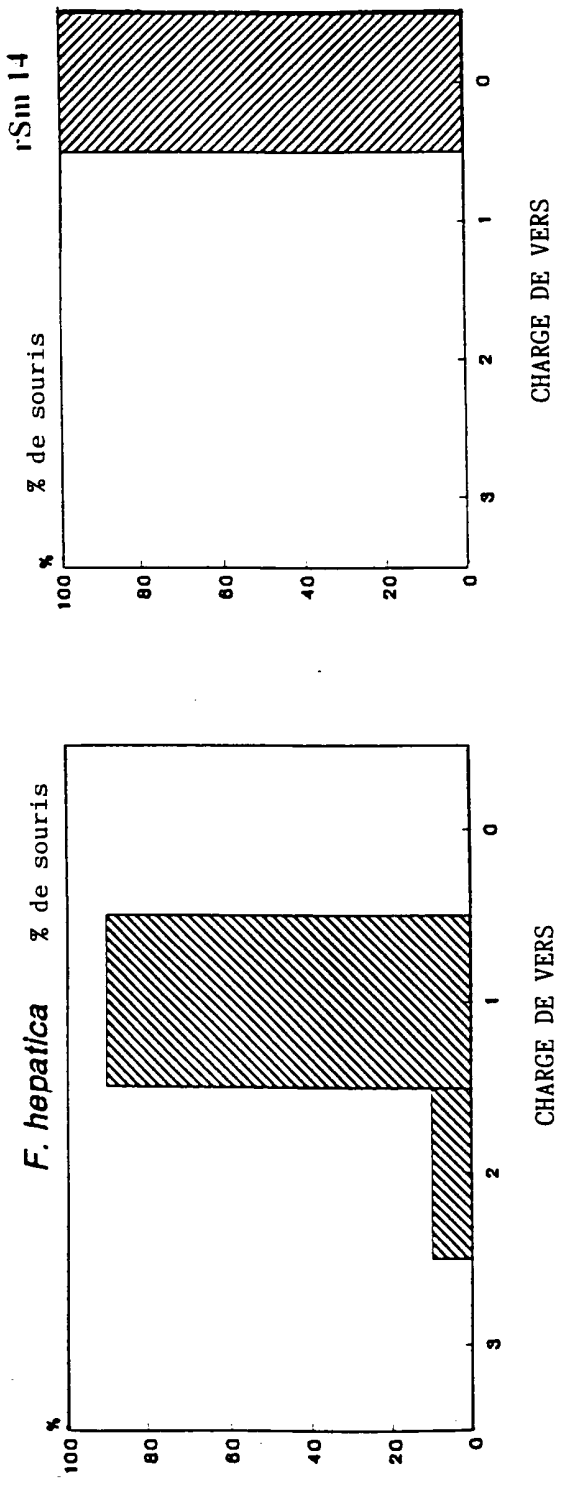


FIGURE 8

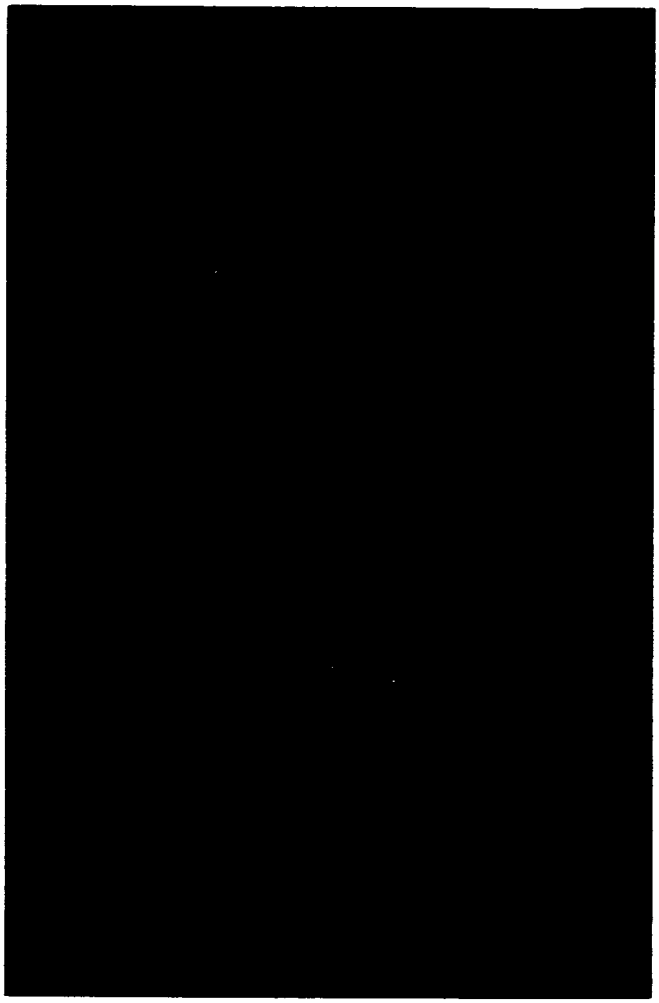


FIGURE 9

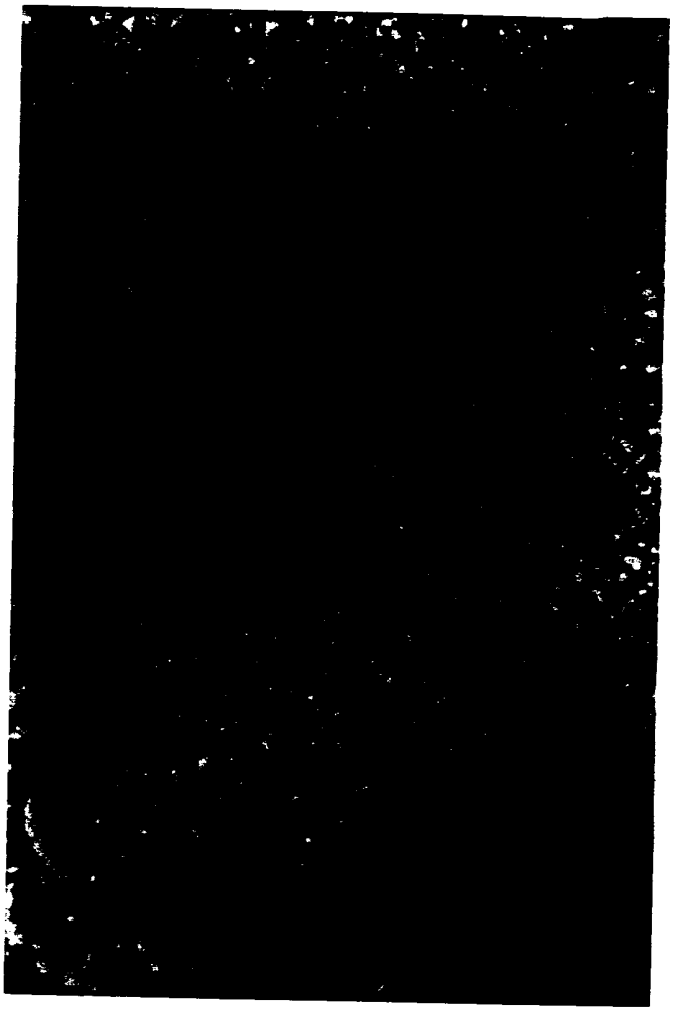


FIGURE 10



FIGURE 11