



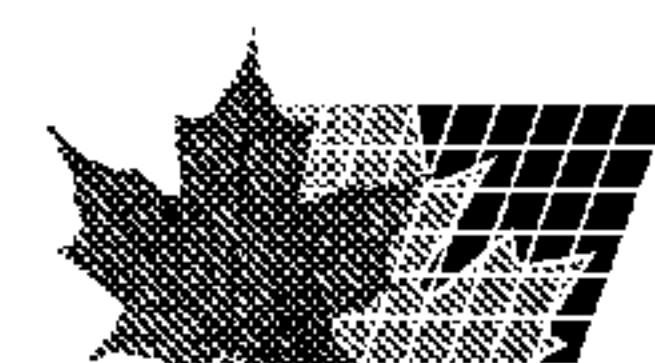
(86) **Date de dépôt PCT/PCT Filing Date:** 2013/02/06
(87) **Date publication PCT/PCT Publication Date:** 2013/08/15
(85) **Entrée phase nationale/National Entry:** 2014/07/22
(86) **N° demande PCT/PCT Application No.:** FR 2013/050252
(87) **N° publication PCT/PCT Publication No.:** 2013/117860
(30) **Priorité/Priority:** 2012/02/06 (FR1251100)

(51) **Cl.Int./Int.Cl. A61K 38/45** (2006.01),
A61K 39/00 (2006.01), **A61P 29/00** (2006.01),
A61P 37/02 (2006.01), **C07K 14/00** (2006.01),
C07K 14/435 (2006.01)
(71) **Demandeurs/Applicants:**
UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE DE LILLE 2,
FR;
INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE
LA RECHERCHE MEDICALE), FR;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE, FR;
CENTRE HOSPITALIER REGIONAL UNIVERSITAIRE
DE LILLE, FR
(72) **Inventeurs/Inventors:**

(54) **Titre : PROTEINES 28KDA GST PROVENANT DE SCHISTOSOMES POUR LEUR UTILISATION DANS LE TRAITEMENT DES
MALADIES INFLAMMATOIRES AUTO-IMMUNES ENGENDRANT UNE REPONSE DE TYPE TH1 ET/OU TH17**
(54) **Title: 28 KDA GST PROTEINS FROM SCHISTOSOMA FOR THE USE THEREOF IN THE TREATMENT OF INFLAMMATORY
AUTOIMMUNE DISEASES GENERATING A TH1 AND/OR TH17 RESPONSE**

(57) **Abrégé/Abstract:**

La présente invention concerne un produit choisi parmi une protéine, un fragment de ladite protéine, une séquence dérivée et une séquence homologue 5 de ladite protéine, ladite protéine comprenant ou étant constituée par la protéine 28kDa Glutathion S-transférase d'un schistosome choisi parmi Schistosoma haematobium, Schistosoma mansoni, Schistosoma bovis représentée respectivement par les séquences SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 2 et SEQ ID NO : 3 pour son utilisation dans le traitement d'une maladie inflammatoire auto-immune engendrant une réponse de type Th1 et/ou Th17.



(72) **Inventeurs(suite)/Inventors(continued):** CAPRON, MONIQUE, FR; EL NADY, MOHAMED, FR;
COLOMBEL, JEAN-FREDERIC, FR; RIVEAU, GILLES, FR

(74) **Agent:** GOUDREAU GAGE DUBUC

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international(43) Date de la publication internationale
15 août 2013 (15.08.2013)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2013/117860 A1

(51) Classification internationale des brevets :

A61K 38/45 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) *A61P 37/02* (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01) *C07K 14/435* (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR2013/050252

(22) Date de dépôt international :

6 février 2013 (06.02.2013)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

1251100 6 février 2012 (06.02.2012) FR

(71) **Déposants** : UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE DE LILLE 2 [FR/—]; 42, rue Paul Duez, F-59800 Lille (FR). INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE [FR/—]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cedex 13 (FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR). CENTRE HOSPITALIER REGIONAL UNIVERSITAIRE DE LILLE [FR/—]; 2, avenue Oscar Lambret, F-59037 Lille Cedex (FR).

(72) **Inventeurs** : CAPRON, Monique; 58, rue du Capitaine Jasmin, F-PHALEMPIN 59133 (FR). EL NADY, Mohamed; Crous Résidence Mermoz, 804, rue Jean Mermoz, F-59139 Wattignies (FR). COLOMBEL, Jean-Frédéric; 11, rue du Lieutenant Colpin, F-59000 Lille (FR). RIVEAU, Gilles; 18, rue Georges Brassens, F-59133 Phalempin (FR).

(74) **Mandataires** : GROSSET-FOURNIER, Chantal et al.; 54, rue Saint-Lazare, F-75009 Paris (FR).

(81) **États désignés** (*sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible*) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) **États désignés** (*sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible*) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))
- avec la partie de la description réservée au listage des séquences (règle 5.2.a))

(54) **Title** : 28 KDA GST PROTEINS FROM SCHISTOSOMA FOR THE USE THEREOF IN THE TREATMENT OF INFLAMMATORY AUTOIMMUNE DISEASES GENERATING A TH1 AND/OR TH17 RESPONSE

(54) **Titre** : PROTEINES 28KDA GST PROVENANT DE SCHISTOSOMES POUR LEUR UTILISATION DANS LE TRAITEMENT DES MALADIES INFLAMMATOIRES AUTO-IMMUNES ENGENDRANT UNE REPONSE DE TYPE TH1 ET/OU TH17

(57) **Abstract** : The present invention concerns a product chosen from a protein, a fragment of said protein, a derived sequence and a homologous sequence of said protein, said protein comprising or being constituted by the 28 kDa glutathione S-transferase protein from a schistosoma chosen from *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma bovis* represented respectively by the sequences SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 and SEQ ID NO: 3 for the use thereof in the treatment of an inflammatory autoimmune disease generating a th1 and/or th17 response.

(57) **Abrégé** : La présente invention concerne un produit choisi parmi une protéine, un fragment de ladite protéine, une séquence dérivée et une séquence homologue 5 de ladite protéine, ladite protéine comprenant ou étant constituée par la protéine 28kDa Glutathion S-transférase d'un schistosome choisi parmi *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma bovis* représentée respectivement par les séquences SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 2 et SEQ ID NO : 3 pour son utilisation dans le traitement d'une maladie inflammatoire auto-immune engendrant une réponse de type Th1 et/ou Th17.



WO 2013/117860 A1

Protéines 28KDa GST provenant de schistosomes pour leur utilisation dans le traitement des maladies inflammatoires auto-immunes engendrant une réponse de type Th1 et/ou Th17

5

La présente invention concerne des protéines particulières qui sont des glutathion-S-transférases provenant de différents parasites schistosomes, pour leur utilisation dans le traitement de maladies inflammatoires auto-immunes telles que la maladie de Crohn ou la sclérose en plaques. La présente invention
10 concerne également les fragments desdites protéines, les séquences dérivées de ces protéines et homologues à ces protéines pour autant que ces séquences et ces fragments puissent engendrer une réponse anti-inflammatoire.

La présente invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant les objets précités et au moins un excipient
15 pharmacologiquement acceptable.

Dans les pays développés, les maladies inflammatoires chroniques liées à un dérèglement du système immunitaire (maladies inflammatoires auto-immunes) touchent environ 8% de la population. Parmi les maladies inflammatoires auto-immunes les plus répandues, on peut citer, les maladies
20 inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) et la sclérose en plaques.

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (maladie de Crohn et rectocolite hémorragique) sont de plus en plus fréquentes dans les pays dits « développés ». Récemment, on assiste malheureusement, dans ces pays, à une augmentation des cas pédiatriques de ces pathologies. Par ailleurs, ces
25 maladies, commencent à faire leur apparition dans les pays dits « en voie de développement », du fait probablement du changement des habitudes alimentaires et des conditions sanitaires. Les traitements classiques des maladies inflammatoires chroniques auto-immunes sont à base d'immunosuppresseurs et/ou de corticostéroïdes. Ces traitements ne sont pas
30 dénués d'effets secondaires graves.

Ainsi, pour ce qui est de la maladie de Crohn, l'azathioprine, le méthotrexate ou la cyclosporine, qui sont des immunosuppresseurs, présentent

une efficacité variable et peuvent être associés à des effets secondaires graves comme des syndromes lympho-prolifératifs ou des fibroses hépatiques.

Les formes aiguës de la maladie de Crohn sont traitées avec des corticostéroïdes dont la toxicité est élevée et qui favorisent l'apparition de l'ostéoporose, du diabète et des infections opportunistes.

Les thérapies biologiques mettent en œuvre l'inhibition du TNF via des anticorps monoclonaux anti-TNF. Ces thérapies permettent de réduire les hospitalisations et les interventions chirurgicales mais engendrent des risques d'infection, de lymphome ou de défaillance cardiaque. De plus, certains patients ne sont pas réactifs à ce type de thérapie qui reste, de plus, très coûteuse. Par ailleurs, chaque récurrence de la maladie risque d'engendrer des conséquences invalidantes pour le patient, comme par exemple, la pose d'une poche de récupération des fèces. La qualité de vie du patient est grandement diminuée.

Dans les formes pédiatriques de ces maladies, et en particulier dans le cas de la maladie de Crohn dont l'incidence a beaucoup augmenté lors des dix dernières années, l'arsenal thérapeutique est très limité. Les immunosuppresseurs ne peuvent pas être utilisés.

Il y a donc un besoin réel et urgent de mettre au point un nouveau traitement préventif et/ou curatif des maladies inflammatoires chroniques liées à un dérèglement du système immunitaire engendrant une réponse inflammatoire de type Th1 et/ou Th17, comme la maladie de Crohn ou la sclérose en plaques, par exemple.

Un premier but de la présente invention est de proposer un nouveau principe actif pour son utilisation dans le traitement préventif et/ou curatif des maladies inflammatoires chroniques engendrant une réponse inflammatoire de type Th1 et/ou Th17.

Un autre but de la présente invention est de proposer un principe actif pour son utilisation dans le traitement préventif et/ou curatif des maladies précitées qui présente une faible toxicité et peu ou pas d'effets secondaires.

Un autre but de la présente invention est de proposer un principe actif pour son utilisation dans le traitement des maladies précitées qui soit susceptible d'être administré aux enfants.

Au moins un de ces buts est atteint au moyen d'un produit choisi parmi une protéine, un fragment de ladite protéine, une séquence dérivée et une séquence homologue de ladite protéine. Selon l'invention, de manière caractéristique,

- ladite protéine comprend ou est constituée par la protéine 28KDa
5 Glutathion S-transférase d'un schistosome choisi parmi *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma bovis* représentée respectivement par les séquences SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 2, et SEQ ID NO : 3 ;

- ledit fragment est un fragment d'une desdites protéines sous réserve
10 qu'il induise une réponse immunitaire de type Th2, ledit fragment comportant, de préférence, au moins la région comprise de l'acide aminé en position 15 à l'acide aminé en position 60, notamment la région comprise de l'acide aminé en position 20 à l'acide aminé en position 50, de préférence la région comprise de l'acide aminé en position 24 à l'acide aminé en position 43 et la région comprise de
15 l'acide aminé en position 170 à l'acide aminé en position 220, notamment la région comprise de l'acide aminé en position 180 à l'acide aminé en position 215, de préférence la région comprise de l'acide aminé en position 190 à l'acide aminé en position 211 de la séquence SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 2 ou SEQ ID NO : 3 ;

20 - ladite séquence dérivée est dérivée d'une desdites séquences SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 2 et SEQ ID NO : 3 ou desdits fragments précités et obtenue notamment par suppression, substitution ou ajout d'un ou plusieurs acides aminés, sous réserve que cette séquence dérivée induise une réponse de type Th2 ;

25 - ladite séquence homologue est une séquence homologue d'une desdites séquence SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 2 et SEQ ID NO : 3 ou d'un desdits fragments, et présente notamment une identité d'au moins 80% et notamment d'au moins 85% avec une desdites séquences SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 2 et SEQ ID NO : 3, sous réserve que ladite séquence homologue induise une
30 réponse de type Th2 ;

pour son utilisation dans le traitement préventif et/ou curatif d'une maladie inflammatoire chronique liée à un dérèglement du système immunitaire générant une réponse immunitaire de type Th1/Th17.

Selon un mode particulier, l'invention concerne un produit choisi parmi une protéine, un fragment de ladite protéine, une séquence dérivée et une séquence homologue de ladite protéine, et de manière caractéristique :

- ladite protéine comprend ou est constituée par la protéine 28KDa
5 Glutathion S-transférase d'un schistosome choisi parmi *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma bovis* représentée respectivement par les séquences SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 2, et SEQ ID NO : 3 ;
- ledit fragment est un fragment d'une desdites protéines sous réserve
10 qu'il induise une réponse immunitaire de type Th2 et/ou diminue la réponse de type Th1, ledit fragment comportant, au moins une région comprise parmi les régions suivantes : la région comprise de l'acide aminé en position 15 à l'acide aminé en position 60, la région comprise de l'acide aminé en position 20 à l'acide aminé en position 50, la région comprise de l'acide aminé en position 24 à l'acide
15 aminé en position 43, la région comprise de l'acide aminé en position 170 à l'acide aminé en position 220, notamment la région comprise de l'acide aminé en position 180 à l'acide aminé en position 215, de préférence la région comprise de l'acide aminé en position 190 à l'acide aminé en position 211 de la séquence SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 2 ou SEQ ID NO : 3 ;
- ladite séquence dérivée est dérivée d'une desdites séquences SEQ ID
20 NO : 1, SEQ ID NO : 2 et SEQ ID NO : 3 ou d'un desdits fragments précités et obtenue notamment par suppression, substitution ou ajout d'un ou plusieurs acides aminés, dans la séquence SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 2 ou SEQ ID NO : 3, ladite séquence dérivée comprenant au moins une région comprise parmi les
25 régions suivantes : la région comprise de l'acide aminé en position 15 à l'acide aminé en position 60, la région comprise de l'acide aminé en position 20 à l'acide aminé en position 50, la région comprise de l'acide aminé en position 24 à l'acide aminé en position 43, la région comprise de l'acide aminé en position 170 à l'acide aminé en position 220, la région comprise de l'acide aminé en position
30 180 à l'acide aminé en position 215 et la région comprise de l'acide aminé en position 190 à l'acide aminé en position 211 de la séquence SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 2 ou SEQ ID NO : 3 ; ceci entraînant l'induction d'une réponse Th2 et/ou la diminution de la réponse Th1 ; et

- ladite séquence homologue est une séquence homologue d'une desdites séquence SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 2 et SEQ ID NO : 3 ou d'un desdits fragments, et présente une identité d'au moins 80% et notamment d'au moins 85% avec au moins l'une des régions suivantes desdites séquences : la région
5 comprise de l'acide aminé en position 15 à l'acide aminé en position 60, la région comprise de l'acide aminé en position 20 à l'acide aminé en position 50, la région comprise de l'acide aminé en position 24 à l'acide aminé en position 43, la région comprise de l'acide aminé en position 170 à l'acide aminé en position 220, la région comprise de l'acide aminé en position 180 à l'acide aminé en position 215,
10 et la région comprise de l'acide aminé en position 190 à l'acide aminé en position 211 de la séquence SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 2 ou SEQ ID NO : 3 ; ou avec la totalité de l'une des séquences SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 2 ou SEQ ID NO : 3 ; ceci entraînant l'induction d'une réponse Th2 et/ou la diminution de la réponse Th1.
- 15 pour son utilisation dans le traitement préventif et/ou curatif d'une maladie inflammatoire chronique liée à un dérèglement du système immunitaire générant une réponse immunitaire de type Th1/Th17.

Selon l'invention le fragment est un fragment d'une desdites protéines et comporte de préférence, au moins la région comprise de l'acide aminé en
20 position 15 à l'acide aminé en position 60, notamment la région comprise de l'acide aminé en position 20 à l'acide aminé en position 50, de préférence la région comprise de l'acide aminé en position 24 à l'acide aminé en position 43 et la région comprise de l'acide aminé en position 170 à l'acide aminé en position 220, notamment la région comprise de l'acide aminé en position 180 à l'acide
25 aminé en position 215, de préférence la région comprise de l'acide aminé en position 190 à l'acide aminé en position 211 de la séquence SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 2 ou SEQ ID NO : 3 , ceci entraînant l'induction d'une réponse Th2 et/ou la diminution de la réponse Th1.

Lorsque le produit de l'invention est une séquence dérivée d'une desdites
30 séquences SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 2 et SEQ ID NO : 3, cette dernière peut avantageusement comporter au moins la région comprise de l'acide aminé en position 15 à l'acide aminé en position 60, notamment la région comprise de l'acide aminé en position 20 à l'acide aminé en position 50, de préférence la

région comprise de l'acide aminé en position 24 à l'acide aminé en position 43 et la région comprise de l'acide aminé en position 170 à l'acide aminé en position 220, notamment la région comprise de l'acide aminé en position 180 à l'acide aminé en position 215, de préférence, la région comprise de l'acide aminé en position 190 à l'acide aminé en position 211 de la séquence SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 2 ou SEQ ID NO : 3, ceci induisant une réponse Th2 et/ou la diminution de la réponse Th1.

Lorsque le produit de l'invention est une séquence homologue telle que précitée, elle comporte avantageusement au moins la région comprise de l'acide aminé en position 15 à l'acide aminé en position 60, notamment la région comprise de l'acide aminé en position 20 à l'acide aminé en position 50, de préférence la région comprise de l'acide aminé en position 24 à l'acide aminé en position 43 et la région comprise de l'acide aminé en position 170 à l'acide aminé en position 220, notamment la région comprise de l'acide aminé en position 180 à l'acide aminé en position 215, de préférence la région comprise de l'acide aminé en position 190 à l'acide aminé en position 211 de la séquence SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 2 ou SEQ ID NO : 3, ceci induisant une réponse Th2 et/ou la diminution de la réponse Th1.

La séquence homologue peut donc comprendre au moins une des régions précitées ou toutes les régions précitées. Ces régions pouvant être identiques aux régions correspondantes des séquences SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2 et SEQ ID NO 3 ou présenter chacune une homologie d'au moins 80% et de préférence d'au moins 85% avec la région correspondante d'une des séquences précitées. Le pourcentage d'homologie peut être différent pour chaque région.

On définit, selon la présente invention une réponse de type Th1 comme étant caractérisée par la présence de lymphocytes produisant des cytokines comme l'IFN gamma mais ne produisant pas d'IL-4 ou d'IL-5. Cette réponse conduit également à la production de TNF.

Une réponse de type Th2 est caractérisée par la présence de lymphocytes produisant des cytokines comme l'IL-4, l'IL-5 ou l'IL-13 mais sans production d'IFN gamma.

La réponse de type Th17 est une réponse inflammatoire où les lymphocytes produisent de l'IL-17 ou de l'IL-25, en plus du TNF produit par de nombreux types cellulaires.

On mesure donc le type de réponse en évaluant les cytokines produites soit par les cellules elles-mêmes (par cytométrie en flux) quand on a accès aux cellules, soit par PCR dans les tissus. On parle de « type » de réponse ; le type de réponse correspond à la réponse majoritaire des cellules ou de l'organisme. En pratique, il y a toujours des réponses mixtes. Un moyen de mesurer la réponse Th1 versus Th2 est de mesurer le rapport IFN γ / IL-4.

Les pathologies auto-immunes génèrent souvent des réponses mixtes et surtout pro-inflammatoires, d'où l'utilisation des biothérapies à base d'anti-TNF.

Selon un mode de réalisation, ladite protéine est représentée par la séquence SEQ ID NO : 1 (28 GST glutathion transférase de *Schistosoma haematobium*), ledit fragment est un fragment de ladite protéine comprenant notamment la région comprise de l'acide aminé en position 15 à l'acide aminé en position 60, notamment la région comprise de l'acide aminé en position 20 à l'acide aminé en position 50, de préférence la région comprise de l'acide aminé en position 24 à l'acide aminé en position 43 et la région comprise de l'acide aminé en position 170 à l'acide aminé en position 220, notamment la région comprise de l'acide aminé en position 180 à l'acide aminé en position 215, de préférence la région comprise de l'acide aminé en position 190 à l'acide aminé en position 211, ladite séquence dérivée est obtenue à partir de SEQ ID NO : 1 et ladite séquence homologue présente une identité telle que précitée avec la séquence SEQ ID NO : 1.

Selon un autre mode de réalisation particulier, ledit produit est le produit d'expression d'une séquence nucléotidique codant pour :

- la protéine 28KDa Glutathion-S-transférase représentée par SEQ ID NO : 1; ou
- un fragment de ladite protéine représentée par SEQ ID NO : 1, ledit fragment comportant ou étant constitué d'au moins la région comprise de l'acide aminé en position 15 à l'acide aminé en position 60, notamment la région comprise de l'acide aminé en position 20 à l'acide aminé en position 50, de préférence la région comprise de l'acide aminé en position 24 à l'acide aminé en

position 43 et la région comprise de l'acide aminé en position 170 à l'acide aminé en position 220, notamment la région comprise de l'acide aminé en position 180 à l'acide aminé en position 215, de préférence la région comprise de l'acide aminé en position 190 à l'acide aminé en position 211 de la séquence SEQ ID NO : 1 ; ou

- une séquence dérivée telle que précitée ; ou
- une séquence homologue telle que précitée ;

ladite séquence nucléotidique codante correspondant notamment à la séquence SEQ ID NO : 4.

10 Selon un mode réalisation particulier, la protéine est le produit d'expression de ladite séquence codante SEQ ID NO : 4 dans *Saccharomyces cerevisiae* ou dans *Escherichia coli*.

Selon l'invention, la maladie précédemment définie est choisie parmi les maladies inflammatoires auto-immunes suivantes : la maladie de Berger, la
15 maladie de Basedow, la thyroïdite d'Hashimoto, le myxoedème primaire, la maladie coéliqua, la rectocolite hémorragique, la maladie de Crohn, l'arthrite rhumatoïde, la cirrhose biliaire primitive, la cholangite sclérosante primitive, les anémies hémolytiques auto-immunes, l'anémie de Biermer (Anémie perniciose), le lupus érythémateux, le syndrome de CREST, le diabète de type 1, la
20 sclérodermie, le pemphigus vulgaire, la pemphigoïde bulleuse, l'épidermolyse Bulleuse Acquisée, la dermatite herpétiforme, la myasthénie, le syndrome myasthénique de Lambert-Eaton, la polymyosite, le syndrome de Goujerot-Sjögren, la sclérose en plaques, la maladie de Graves et le psoriasis.

Selon l'invention, le traitement de la pathologie précitée peut s'appliquer à
25 tout patient, humain ou animal. Il s'applique en particulier à l'être humain, adulte ou enfant. Selon l'invention, le traitement peut concerner plus particulièrement un enfant et plus particulièrement le traitement préventif chez l'enfant.

On définit par « enfant », un individu âgé de 0 à 18 ans, plus particulièrement âgé de 9 à 18 ans.

30 La présente invention concerne également une composition pharmaceutique, ladite composition comprenant, en tant qu'agent actif, un produit selon l'invention et un excipient pharmacologiquement acceptable, notamment pour le traitement préventif et/ou curatif d'une maladie inflammatoire

chronique liée à un dérèglement du système auto-immunitaire générant une réponse immunitaire de type Th1 et/ou Th17.

Par « pharmacologiquement acceptable », on entend au sens de la présente invention, tout excipient susceptible d'être injecté, ingéré ou au moins
5 appliqué sur la peau sans engendrer de réaction secondaire qui serait, de manière statistique, supérieure au bénéfice procuré par le traitement.

Selon l'invention, la composition est avantageusement utilisée dans le traitement préventif et/ou curatif d'une maladie choisie parmi les maladies inflammatoires auto-immunes suivantes : la maladie de Berger, la maladie de
10 Basedow, la thyroïdite d'Hashimoto, le myxoedème primaire, la maladie coéliqua, la rectocolite hémorragique, la maladie de Crohn, l'arthrite rhumatoïde, la cirrhose biliaire primitive, la cholangite sclérosante primitive, les anémies hémolytiques auto-immunes, l'anémie de Biermer (Anémie pernicieuse), le lupus érythémateux, le syndrome de CREST, le diabète de type 1, la sclérodermie, le
15 pemphigus vulgaire, la pemphigoïde bulleuse, l'épidermolyse Bulleuse Acquisée, la dermatite herpétiforme, la myasthénie, le syndrome myasthénique de Lambert-Eaton, la polymyosite, le syndrome de Goujerot-Sjögren, la sclérose en plaques, la polyarthrite rhumatoïde, la maladie de Graves et le psoriasis, en particulier les formes pédiatriques de ces pathologies, lorsqu'elles existent, et notamment le
20 traitement à titre préventif et plus particulièrement le traitement préventif des formes pédiatriques.

L'action immunogène du produit et/ou de la composition selon l'invention peut être la réduction ou la suppression de la réaction inflammatoire (de type Th1 notamment) et/ou l'induction d'une réponse immune de type Th2 via, par
25 exemple, la sécrétion de certaines interleukines.

La présente invention concerne également ladite composition pharmaceutique en tant que vaccin et utilisable pour le traitement d'une maladie auto-immune engendrant une réponse de type Th1 et/ou Th17 et en particulier pour le traitement des pathologies précitées. Ce vaccin peut s'adresser
30 notamment aux enfants.

Selon l'invention, la composition peut comprendre un adjuvant, notamment un adjuvant choisi parmi les sels d'aluminium et plus particulièrement l'hydroxyde d'aluminium. L'hydroxyde d'aluminium est un adjuvant de la réponse immunitaire

utilisé en vaccinologie et compatible avec l'usage humain. Formant un réseau ionique, les protéines antigéniques s'y adsorbent après quelques minutes d'incubation. Ce complexe crée un dépôt transitoire permettant un recrutement cellulaire et favorisant la réponse antigénique de type Th2.

5 Le terme « sels d'aluminium » désigne tous les sels existants à l'état naturel ou non de l'aluminium. Il s'agit, par exemple, du sulfate d'aluminium (hydraté ou non), du phosphate d'aluminium, de l'alun ($KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$), de l'hydroxyde d'aluminium ou de tout autre sel de formule ($BAI(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$).

Selon l'invention, la concentration en adjuvant est comprise de 0,5 mg/ml à 10 2 mg/ml, notamment de 0,3 mg/ml à 1 mg/ml et en particulier de 220 µg/ml à 280 µg/ml et de préférence sensiblement égale à 250 µg/ml.

Comme illustré ci-après, de bons résultats sont obtenus avec l'hydroxyde d'aluminium à une concentration comprise dans la plage de concentrations précitée et notamment de 250 µg/ml.

15 La présente invention concerne également un produit choisi parmi une protéine, un fragment de ladite protéine, une séquence dérivée et une séquence homologue de ladite protéine, caractérisé en ce que :

- ladite protéine comprend ou est constituée par la protéine 28KDa Glutathion S-transférase de *Schistosoma japonicum* ou par la protéine 26KDa 20 Glutathion S-transférase de *Schistosoma japonicum* représentées respectivement par les séquences SEQ ID NO : 5, et SEQ ID NO : 6,

- en ce que ledit fragment est un fragment d'une desdites protéines sous réserve qu'il induise principalement une réponse immunitaire de type Th2,

- en ce que ladite séquence dérivée est dérivée d'une desdites séquences 25 SEQ ID NO : 5, et SEQ ID NO : 6 ou desdits fragments précités et obtenue notamment par suppression, substitution ou ajout d'un ou plusieurs acides aminés, sous réserve que cette séquence dérivée induise principalement une réponse de type Th2.

- et en ce que ladite séquence homologue est une séquence homologue 30 d'une desdites séquence SEQ ID NO : 5, et SEQ ID NO : 6 ou d'un desdits fragments, et présente notamment une identité d'au moins 80% et notamment d'au moins 85% avec une desdites séquences SEQ ID NO : 5, et SEQ ID NO : 6, sous réserve que ladite séquence homologue induise principalement une

réponse de type Th2 ; pour son utilisation dans le traitement préventif et/ou curatif d'une maladie inflammatoire chronique liée à un dérèglement du système immunitaire générant une réponse immunitaire de type Th1 et/ou Th17, en particulier chez un enfant.

5 La maladie inflammatoire chronique liée à un dérèglement du système immunitaire générant une réponse immunitaire de type Th1 et/ou Th17 peut être choisie parmi la maladie de Crohn, la rectocolite hémorragique, la sclérose en plaques, la polyarthrite rhumatoïde, le diabète de type1 (auto-immun), la maladie de Graves et le psoriasis

10 La présente invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant en tant que qu'ingrédient actif, au moins un des produits tels que précités en référence à Sj28GST et Sj26GST et un excipient pharmacologiquement acceptable.

 Cette composition peut également comporter un adjuvant tel que précité et
15 en particulier l'hydroxyde d'aluminium. La quantité d'adjuvant peut être telle que précitée.

 La protéine native 28kDa glutathion S-transférase native est une protéine exprimée par les parasites schistosomes, vers plats, responsables de la bilharziose. Il existe plusieurs espèces de schistosomes. *Schistosoma mansoni*
20 est responsable chez l'Homme, de bilharziose intestinale, en Afrique et au Brésil. *Schistosoma haematobium* est responsable, chez l'Homme, de bilharziose urinaire en Afrique et Péninsule arabique. Chaque espèce de schistosome exprime une 28kDa glutathion S-transférase qui lui est propre. Ainsi, l'espèce *Schistosoma mansoni* exprime la Sm28GST, l'espèce *Schistosoma*
25 *haematobium* exprime la Sh28GST, *Schistosoma bovis* (schistosome infectant le bétail) exprime la Sb28GST et l'espèce *Schistosoma japonicum* (touchant l'Asie du sud-est –Philippines et sud Chine-) exprime la Sj28GST et la Sj26GST. Les gènes codant ces protéines sont connus et/ou l'Homme du Métier est capable de les identifier. L'Homme du Métier est donc à même de produire de manière
30 recombinante les protéines précitées et les produits de l'invention.

 Les protéines Sh28GST, Sm28GST, Sb28GST, Sj28GST et Sj26GST ont des séquences qui sont identifiées et répertoriées dans les bases de données, notamment, sur le site <http://www.uniprot.org/uniprot/P30114>. Les protéines

Sb28GST et Sh28GST sont identiques à 97% alors que les protéines Sh28GST et Sm28GST sont identiques à 91%.

Les séquences SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 2, SEQ ID NO : 3, SEQ ID NO : 5 et SEQ ID NO : 6 ci-après représentent respectivement les séquences
5 des protéines Sh28GST, Sm28GST, Sb28GST, Sj28 GST et Sj26GST.

Il est connu que les parasites induisent une réponse immunitaire de la part de l'hôte infesté. Ainsi, il est connu que le schistosome a une action sur le système immunitaire de l'hôte qu'il infeste de manière à ce que ce dernier ne le rejette pas. La réaction immunitaire de l'hôte commence par une réaction de type
10 Th1, de courte durée puis se poursuit par une réaction de type Th2 et enfin par une réaction T régulatrice. Lorsque se produit la réponse T régulatrice, l'hôte infecté et le parasite coexistent.

Il est connu que les maladies inflammatoires chroniques liées à un dérèglement du système immunitaire engendrent chez les patients, une réponse
15 immunitaire anormale vers les auto-antigènes, ce qui induit une inflammation. Dans les cas de la maladie de Crohn et de la rectocolite hémorragique, on observe une inflammation de la muqueuse intestinale caractérisée par des ulcérations et une infiltration des cellules inflammatoires recrutées par des cytokines et chimio-attractants de type Th1, entre autres.

20 Dans le cas de la sclérose en plaques, on observe une inflammation locale de la gaine de myéline des axones du cerveau et de la moelle épinière qui engendre une démyélinisation des fibres nerveuses.

Les inventeurs ont montré que, de manière surprenante, la protéine Sh28GST permet, en engendrant une réponse anti-inflammatoire de type Th2,
25 de réduire la réponse de type Th1. Cette diminution de la réponse de type Th1 permet de réduire les symptômes liés à la maladie précitée, en particulier l'inflammation. La protéine agissant, notamment sur les interleukines qui sont présentes dans tout l'organisme, elle permet donc de traiter, de manière préventive ou curative, une maladie telle que précitée affectant n'importe quel
30 organe ou même l'organisme entier. Les mêmes effets peuvent être envisagés pour tous les produits de l'invention.

De plus, il est connu qu'il existe un lien entre inflammation et cancer, la première favorisant l'apparition du second. La protéine selon l'invention peut

ainsi en réduisant directement ou indirectement l'inflammation chronique, réduire voir éliminer les cancers induits par l'inflammation chronique liée à la maladie inflammatoire auto-immune. Ainsi, la rectocolite hémorragique et la maladie de Crohn sont des facteurs de sur risque du cancer colorectal.

5 Les résultats ci-après confirment l'effet de la protéine Sh28GST dans le traitement (notamment préventif) de la maladie de Crohn qui est une maladie inflammatoire auto-immune engendrant une réponse de type Th1.

La protéine selon l'invention, quel que soit le schistosome dont elle provient et quel que soit son poids moléculaire peut être naturelle isolée (native) ou
10 recombinante.

Dans toute la présente demande de brevet, les termes de « 28KDa glutathion S-transférase recombinante » (rSh28GST) désignent toute protéine obtenue de manière recombinante par insertion dans un organisme hôte de la séquence totale codant pour la Sh28GST (SEQ NO : 4) ou d'une fraction de
15 cette séquence. Cette synthèse peut être effectuée dans différentes cellules hôtes, bactéries, levures ou cellules supérieures, en fonction du vecteur dans lequel la séquence codante est insérée et des signaux de contrôle d'expression. La protéine recombinante selon la présente invention peut présenter une structure primaire identique à celle de la protéine Sh28GST native, présente
20 chez *Schistosoma haematobium*, mais elle peut aussi être un dérivé de celle-ci ou une protéine Sh28GST incomplète (fragment de protéine) mais ayant une activité immunogène. Cette protéine ou ce fragment de protéine peut également être fusionné à une autre protéine (ou fragment de protéine), suite à une manipulation génétique des segments d'ADN correspondants, afin de favoriser
25 une meilleure expression de la protéine dans la cellule hôte ou éventuellement de provoquer son excrétion hors de la cellule.

Dans les exemples, le terme de rSh28GST désigne la protéine produite dans *Saccharomyces cerevisiae* par l'insertion de la séquence nucléotidique codante SEQ NO : 4.

30 La protéine rSh28GST est bien connue. Ainsi, l'article «Crystal structure of the 28KDa glutathione S-transferase from *Schistosoma haematobium*» précité cite une méthode de production de la Sh28GST recombinante selon l'invention dans *Escherichia coli*. De même, l'article « Vaccine potential of a recombinant

glutathione S-transferase cloned from *Schistosoma haematobium* in primates experimentally infected with an homologous challenge » publié dans la revue Vaccine en 1999, cite une protéine Sh28GST recombinante produite dans une souche spécifique de *Saccharomyces cerevisiae*.

5 La protéine recombinante de l'invention n'est néanmoins pas limitée à ces deux exemples précités, les technologies permettant le clonage et l'expression d'un gène étranger ou d'un fragment de gène étranger, dans différentes cellules hôtes étant connues de l'Homme du Métier.

10 La production de la protéine recombinante dans ces bactéries est déjà connue et parfaitement maîtrisée. En effet, la protéine rSh28GST recombinante fait l'objet d'essais cliniques pour la vaccination contre la bilharziose (projet Bilhvax). Cette protéine recombinante est donc produite à l'échelle industrielle ; sa production et sa purification, notamment à des fins thérapeutiques, sont donc parfaitement maîtrisées.

15 En effet, comme décrit plus en détails ultérieurement, le produit selon l'invention permet d'obtenir un effet préventif sur la pathologie précitée. L'administration de la protéine ou du fragment de protéine avant l'épisode inflammatoire de la pathologie permet d'obtenir une diminution de l'inflammation et un basculement de la réponse immunitaire de l'organisme du patient d'une
20 réponse de type Th1, caractéristique de la pathologie, vers une réponse de type Th2, lors d'une poussée de la maladie. C'est le changement de type de réponse immunitaire observé après traitement avec la protéine et/ou le fragment de protéine selon l'invention qui permet de traiter à titre préventif les maladies inflammatoires chroniques de divers organes et même des maladies atteignant
25 un système tout entier, comme par exemple, le système nerveux. On entend par « traitement préventif », tout traitement qui, administré avant la poussée inflammatoire, permet de supprimer une poussée inflammatoire ou de diminuer en intensité et/ou en durée une poussée inflammatoire et/ou qui est capable d'allonger la durée de temps entre deux poussées inflammatoires. L'effet du
30 traitement peut être évalué sur l'état inflammatoire de l'organe ou du système concerné.

On entend par traitement curatif, tout traitement qui administré lors d'une poussée inflammatoire, permet d'atténuer ou de supprimer la poussée, en

particulier l'un des symptômes (notamment l'inflammation locale, par exemple de la paroi intestinale) liés à la poussée.

Comme expliqué ultérieurement, le produit selon l'invention agit à travers la diminution de la sécrétion d'interleukines spécifiques d'une réponse inflammatoire de type Th1 et/ou la production accrue d'interleukines correspondant à une réponse immune de type Th2. Ces interleukines circulent dans tout l'organisme et leur diminution ou leur augmentation affecte potentiellement tous les organes.

On verra ultérieurement que le produit selon l'invention permet la production d'interleukines ayant un rôle régulateur (IL-10) dans les maladies chroniques inflammatoires liées à un dérèglement du système immunitaire engendrant une réponse de type Th1 et/ou Th17. Il était connu que l'infestation par des vers parasites de type ascaris des patients atteints de sclérose en plaques réduit l'évolution de la maladie (voir « Association between parasite infection and immune responses in multiple sclerosis » *Annals of Neurology* 2007). En revanche rien n'indiquait qu'une protéine spécifique de *Schistosoma* pouvait avoir un effet curatif et ou préventif sur une pathologie affectant tout le système nerveux d'un organisme. C'est donc le mérite des inventeurs d'avoir testé le produit selon l'invention sur une maladie inflammatoire chronique liée à un dérèglement du système immunitaire appartenant aux maladies neurologiques et affectant tout le système nerveux, comme, notamment, la sclérose en plaques.

Le patient visé par le traitement n'est pas limité selon l'invention. Il peut s'agir, d'un animal, d'un mammifère, plus particulièrement d'un être humain. Il peut également s'agir d'un enfant. Le projet Bilhvax a en effet montré la parfaite innocuité de la protéine recombinante rSh28GST selon l'invention chez les enfants âgés de 5 à 12 ans. Les produits selon l'invention peuvent donc être utilisés pour le traitement des cas pédiatriques des maladies inflammatoires chroniques liées à un dérèglement du système immunitaire, et en particulier des cas pédiatriques de ces maladies. Ainsi, en cas de forte suspicion d'un facteur génétique provoquant ladite maladie ou rendant le patient plus susceptible de développer la maladie (cas d'un enfant dont les deux parents ont développé la

maladie de Crohn, par exemple), le produit selon l'invention pourra être administré à titre préventif.

Avantageusement, la composition est administrée à une dose de protéine allant de 50µg/Kg à 1000µg/Kg. La dose peut être égale à 50µg/Kg, 500µg/Kg ou
5 1000µg/Kg.

La concentration de protéine purifiée administrée par enfant est, par exemple, égale à 253 ug (ce qui correspond à une dose finale de 100 ug du vaccin Bilhvax comprenant la rSh28GST28 plus l'hydroxyde d'aluminium à une concentration de 1 mg/ml): La dose de protéine peut être, par exemple
10 supérieure ou égale à 100 ug et inférieure ou égale à 500 ug de protéine.

Le mode d'administration de la composition de l'invention n'est pas limité selon l'invention. La composition peut être injectée par voie sous-cutanée ou administrée par voie muqueuse, par exemple. La composition selon l'invention peut être administrée, par exemple, sous la forme d'un spray nasal ou buccal,
15 d'un suppositoire, d'un comprimé, d'un lyophilisat, d'une gélule, d'un sirop, d'une solution injectable par voie intraveineuse, sous-cutanée ou intra musculaire, d'une pommade ou gel pour application topique.

La présente invention, ses caractéristiques et les différents avantages qu'elle procure apparaîtront mieux à la lecture de la description qui suit et fait
20 référence à des exemples cités à titre non limitatif et aux figures annexées suivantes, sur lesquelles :

- La figure 1 représente les scores macroscopiques et histologiques obtenus pour différents groupes de rats, le groupe 1 étant le groupe traité avec la protéine de l'invention avant l'induction de la colite, le groupe 2 étant le groupe
25 infecté avec *Schistosoma mansoni* avant l'induction de la colite par le TNBS et le groupe 3 étant le groupe témoin. Le groupe 1 est représenté par le chiffre 1 sur l'axe des abscisses, le groupe 2 est représenté par le chiffre 2 sur l'axe des abscisses et le groupe 3 est représenté par le chiffre 3 sur l'axe des abscisses. Le score macroscopique est représenté par la colonne comportant les rayures
30 diagonales et le score histologique est représenté par la colonne blanche. Les scores macroscopiques et histologiques sont quantifiés par l'axe des ordonnées ;

- La figure 2 représente le rapport du taux de myéloperoxidase (MPO) sur le taux de protéines totales dans les groupes de rats cités en référence à la

figure 1, le groupe 1 étant représenté par le chiffre 1 sur l'axe des abscisses, le groupe 2 étant représenté par le chiffre 2 sur l'axe des abscisses et le groupe 3 étant représenté par le chiffre 3 sur l'axe des abscisses. L'axe des ordonnées représente le rapport du taux de MPO sur le taux de protéines totales exprimé en ng/mg ;

- La figure 3 représente la quantité d'ARN messenger codant pour les interleukines IL-1b, IL-13, IL-5 et IL-10 dans les mêmes groupes de rats que ceux utilisés en référence à la figure 1, le groupe 1 étant représenté par le chiffre 1 sur l'axe des abscisses, le groupe 2 étant représenté par le chiffre 2 sur l'axe des abscisses et le groupe 3 étant représenté par le chiffre 3 sur l'axe des abscisses. La quantité d'ARN messenger codant pour l'interleukine IL-1b est représentée par les colonnes comportant des fines rayures diagonales, la quantité d'ARN messenger codant pour l'interleukine IL-13 est représentée par les colonnes comportant des grosses rayures diagonales, la quantité d'ARN messenger codant pour l'interleukine IL-5 est représentée par les colonnes blanches et la quantité d'ARN messenger codant pour l'interleukine IL-10 est représentée par les colonnes comportant des rayures verticales. L'axe des ordonnées représente les quantités d'ARN messenger en U.A. ;

- La figure 4 représente le rapport du taux d'ARN messenger codant pour l'arginase de type I (Arg) sur le taux d'ARN messenger codant pour l'oxyde nitrique synthétase inductible (iNOS) dans les mêmes groupes de rats que ceux utilisés en référence à la figure 1, le groupe 1 étant représenté par le chiffre 1 sur l'axe des abscisses, le groupe 2 étant représenté par le chiffre 2 sur l'axe des abscisses et le groupe 3 étant représenté par le chiffre 3 sur l'axe des abscisses. L'axe des ordonnées représente le rapport du taux d'ARN messenger codant pour l'arginase de type I (Arg) sur le taux d'ARN messenger codant pour l'oxyde nitrique synthétase inductible (iNOS) ;

- La figure 5 représente les scores macroscopiques et histologiques obtenus pour différents groupes de souris, le groupe 1 étant le groupe témoin, le groupe 2 étant le groupe traité avec de l'acide 5-aminosalicylique avant l'induction de la colite, le groupe 3 étant le groupe traité avec la protéine selon l'invention avant l'induction de la colite et le groupe 4 étant le groupe qui reçoit une injection d'éthanol avant l'induction de la colite. Le groupe 1 est représenté

par le chiffre 1 sur l'axe des abscisses, le groupe 2 est représenté par le chiffre 2 sur l'axe des abscisses, le groupe 3 est représenté par le chiffre 3 sur l'axe des abscisses et le groupe 4 est représenté par le chiffre 4 sur l'axe des abscisses. Le score macroscopique est représenté par les colonnes comportant des rayures diagonales et le score histologique est représenté par les colonnes blanches. Les scores macroscopiques et histologiques sont quantifiés par l'axe des ordonnées ;

- La figure 6 représente le rapport du taux de myéloperoxydase sur le taux de protéines totales dans les groupes de souris cités en référence à la figure 5, le groupe 1 étant représenté par le chiffre 1 sur l'axe des abscisses, le groupe 2 étant représenté par le chiffre 2 sur l'axe des abscisses, le groupe 3 étant représenté par le chiffre 3 sur l'axe des abscisses et le groupe 4 étant représenté par le chiffre 4 sur l'axe des abscisses. L'axe des ordonnées représente le rapport du taux de MPO sur le taux de protéines totales exprimé en ng/mg ;

- La figure 7 représente la quantité d'ARN messager codant pour l'interleukine IL-1b dans les mêmes groupes de souris que ceux utilisés en référence à la figure 5, le groupe 1 est représenté par le chiffre 1 sur l'axe des abscisses, le groupe 2 est représenté par le chiffre 2 sur l'axe des abscisses, le groupe 3 est représenté par le chiffre 3 sur l'axe des abscisses et le groupe 4 est représenté par le chiffre 4 sur l'axe des abscisses. L'axe des ordonnées représente la quantité d'ARN messager en U.A. ;

- La figure 8 représente la quantité d'ARN messager codant pour les interleukines IL-5 et IL-13 dans les mêmes groupes de souris que ceux utilisés en référence à la figure 5. Le groupe 1 est représenté par le chiffre 1 sur l'axe des abscisses, le groupe 2 est représenté par le chiffre 2 sur l'axe des abscisses, le groupe 3 est représenté par le chiffre 3 sur l'axe des abscisses et le groupe 4 est représenté par le chiffre 4 sur l'axe des abscisses. La quantité d'ARN messager codant pour l'interleukine IL-5 est représentée par les colonnes blanches et la quantité d'ARN messager codant pour l'interleukine IL-13 est représentée par les colonnes comportant des rayures diagonales. L'axe des ordonnées représente la quantité d'ARN messager en U.A. ;

- La figure 9 représente la quantité d'ARN messager codant pour l'interleukine IL-10 dans les mêmes groupes de souris que ceux utilisés en

référence à la figure 5. Le groupe 1 est représenté par le chiffre 1 sur l'axe des abscisses, le groupe 2 est représenté par le chiffre 2 sur l'axe des abscisses, le groupe 3 est représenté par le chiffre 3 sur l'axe des abscisses et le groupe 4 est représenté par le chiffre 4 sur l'axe des abscisses. L'axe des ordonnées
5 représente la quantité d'ARN messenger en U.A. ;

- La figure 10 représente le rapport du taux d'ARN messenger codant pour l'arginase de type I sur le taux d'ARN messenger codant pour l'oxyde nitrique synthétase inductible dans les mêmes groupes de souris que ceux utilisés en référence à la figure 5. Le groupe 1 est représenté par le chiffre 1 sur l'axe des
10 abscisses, le groupe 2 est représenté par le chiffre 2 sur l'axe des abscisses, le groupe 3 est représenté par le chiffre 3 sur l'axe des abscisses et le groupe 4 est représenté par le chiffre 4 sur l'axe des abscisses. L'axe des ordonnées représente le rapport du taux d'ARN messenger codant pour l'arginase de type I sur le taux d'ARN messenger codant pour l'oxyde nitrique synthétase inductible ;

15 - La figure 11 représente l'analyse des poids des différents groupes de rats à J35 dans l'étude de l'encéphalite allergique expérimentale (modèle de la sclérose en plaques). Le groupe A correspond au groupe de rats ayant reçu deux injections de 5µg/Kg de rSh28GST en combinaison avec de l'hydroxyde d'aluminium (alum) avant l'induction de l'EAE, il est représenté en abscisse par la
20 lettre A, le groupe B correspond au groupe de rats ayant reçu deux injections de 0,5µg/Kg de rSh28GST en combinaison avec l'hydroxyde d'aluminium (alum) avant l'induction de l'EAE, il est représenté en abscisse par la lettre B, le groupe C correspond au groupe de rats ayant reçu deux injections d'hydroxyde d'aluminium seul avant l'induction de l'EAE, il est représenté en abscisse par la
25 lettre C, le groupe D correspond au groupe de rats n'ayant reçu aucune injection avant l'induction de l'EAE, il est représenté sur l'axe des abscisses par la lettre D. L'axe des ordonnées représente le poids des rats des différents groupes.

- La figure 12 représente l'analyse des poids (en g) des différents groupes de rats cités en référence à la Figure 11, à J42, les lettres de référence des
30 groupes sont indiquées sur l'axe des abscisses tandis que le poids des rats est indiqué sur l'axe des ordonnées ;

- La figure 13 représente l'analyse des poids (en g) des différents groupes de rats cités en référence à la Figure 11, à J48 les lettres de référence des

groupes sont indiquées sur l'axe des abscisses tandis que le poids des rats est indiqué sur l'axe des ordonnées; et

- La figure 14 représente les scores cumulés pour les différents groupes de rats cités en référence à la Fig. 11, les lettres de référence des groupes sont indiquées sur l'axe des abscisses tandis que les scores cumulés sont indiqués sur l'axe des ordonnées ; en référence à la figure 14, les rats des groupes A et C ont reçu trois injections, respectivement à J0, J14 et J28, de 5µg/Kg de rSh28GST en combinaison avec de l'hydroxyde d'aluminium (alum) pour le groupe A et d'alum seul pour le groupe C, avant l'induction de l'EAE à J35 ;

Pour les figures 11 à 13, les résultats sont présentés sous forme de box-and-whisket plots. Les tests statistiques de Kruskal-Wallis et Mann Whitney ont été réalisés afin de déterminer les différences significatives entre les rats des différents groupes. * $P < 0.05$.

PARTIE EXPERIMENTALE

Modèle de la maladie de Crohn

Protocole expérimental de la colite induite chez le rat par le TNBS (modèle de la maladie de Crohn)

Les animaux utilisés sont des rats Sprague Dawley mâles (180 à 250g). On pèse les animaux puis on supprime la nourriture la veille de manière à ce qu'ils soient à jeun le jour de l'induction de la colite. Les rats sont endormis au pentobarbital (40mg/kg) en injection intra-péritonéale. On injecte intra-rectalement 250µl d'une solution de TNBS (2,4,6 TrinitroBenzene Sulfonic Acid) dilué dans de l'éthanol 100% (volume pour volume) à raison de 80 mg par kg de rat. On évalue la colite 96h après l'injection de TNBS : les animaux sont pesés et sacrifiés avec une injection de 300µl de T61 en intracardiaque. On prélève le colon pour évaluer le score macroscopique. Une section transversale de colon à 4 cm du rectum est également prélevée puis épinglée sur un morceau de liège afin d'y être plongée dans un bain de paraformaldéhyde à 4% pendant 24 heures puis dans un bain d'éthanol à 70% avant déshydratation et inclusion en paraffine pour évaluer le score histologique.

Protocole expérimental de la colite induite chez la souris par le TNBS (modèle de la maladie de Crohn)

Les animaux sont des souris mâles de fond génétique C57BL/6. Elles sont anesthésiées avec un mélange de xylasine-kétamine à la dose de 50mg/kg chacun par voie sous-cutanée. La colite est induite intra-rectalement avec 40µl de solution de TNBS dilué dans de l'éthanol 100% (volume pour volume) à raison de 150 mg par kg de souris. Pour les injections intra-rectales d'éthanol, il s'agit d'éthanol à 50%. (Contrôle solvant).

Protocole expérimental d'infestation par *Schistosoma mansoni*

Les rats sont anesthésiés avec un mélange de valium (8mg/kg) et de kétamine (75mg/kg) en injection intra-péritonéale puis rasés au niveau de l'abdomen. Une solution contenant 2000 cercaires (larves infectantes) de *Schistosoma mansoni* est déposée pendant 30 minutes sur l'abdomen des animaux, les cercaires pénètrent par voie transcutanée. Cette infestation représente le « gold standard » de l'expérience.

Protocole d'étude de la rSh28GST dans la sclérose en plaques (Maladie auto-immune de type Th1)

Ce modèle d'étude de la sclérose en plaques comprend l'injection d'un peptide encéphalitogène de protéines de la myéline (MBP,) pour l'induction d'une maladie auto-immune, appelée EAE (encéphalite allergique expérimentale). Afin de démontrer le caractère préventif de la rSh28GST, on injecte à rats Lewis de 4 semaines une dose de 5µg/Kg de rSh28GST en mélange avec de l'hydroxyde d'aluminium (voir le paragraphe « préparation de la composition testée »). Quatre semaines plus tard, on induit l'EAE (J=35). On effectue un score clinique à J=44 (première poussée). Le pic de l'EAE se situe à J=48. On observe à J=55, la récupération plus ou moins complète de l'animal. On mesure tout au long du protocole la perte de poids de l'animal, on effectue un score clinique, on quantifie les infiltrats inflammatoires et l'on mesure la démyélinisation à des points critiques (IHC).

Protocole pour montrer l'effet curatif de la rSh28GST dans le cas de la sclérose en plaques

On utilise un modèle de rat EAE. On immunise les rats Lewis avec une composition de la rSh28GST et de l'hydroxyde d'aluminium en même temps que l'induction de l'EAE, éventuellement à des points critiques de la maladie. La dose injectée est égale à 5µg/Kg, 50µg/Kg, 500µg/Kg et 1000µg/Kg (ces chiffres

faisant référence à la dose de rSh28GST, la concentration en hydroxyde d'aluminium étant toujours comme indiqué dans le paragraphe « préparation de la composition testée ») On analyse ensuite les différentes populations cellulaires d'intérêts.

5 Protocole d'étude de la polyarthrite rhumatoïde (PR)

On réalise 2 injections de collagène (auto antigène) par voie intradermique à la base de la queue des souris et on mesure l'arthrite de la patte après 21 jours selon un score classique. On effectue ensuite le suivi des paramètres immunologiques (Anticorps, cytokines, cellules régulatrices).

10 Pour la détermination de l'effet préventif, on injecte avant les deux injections de collagène une dose de 1000µg/Kg de rSh28GST mélangé à de l'hydroxyde d'aluminium (voir le paragraphe « préparation de la composition testée »). Pour démontrer l'effet curatif, on réalise une injection de la composition testée (1000µg/Kg pour la protéine rSh28GST) en même temps que les deux injections
15 de collagène précitées.

Dosage de la myéloperoxydase (MPO)

Le taux de myéloperoxydase contenue dans les tissus coliques est évalué par la méthode immunologique de type ELISA Sandwich (« Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay ») et est rapporté au taux de protéines contenues dans
20 ce même tissu colique.

Le tissu colique (contenant la MPO en cas d'inflammation) est tout d'abord broyé afin d'en obtenir un homogénéisat. Celui-ci est déposé dans un puits de la plaque déjà recouvert avec un anticorps anti-MPO. La réaction antigène (ici MPO)-anticorps anti-MPO se réalise alors. Un second anticorps dirigé contre la
25 molécule de MPO et marqué par la biotine est ensuite ajouté et est révélé grâce à l'addition de streptavidine (très affine pour la biotine) couplée avec un chromogène. En présence de son substrat, ce dernier libère une substance colorée dont la densité optique est évaluée par un spectrophotomètre. La densité optique mesurée est proportionnelle à la quantité de protéine MPO contenue
30 dans l'homogénéisat du tissu colique.

Préparation de la composition testée (protéine rSh28GST+ hydroxyde d'aluminium)

La protéine rSh28GST utilisée est la protéine recombinante produite dans *Saccharomyces cerevisiae* et fabriquée par la société Eurogentec. La séquence totale du gène représentée par la séquence SEQ ID NO : 4 est utilisée. La protéine se présente sous forme lyophilisée, une fiole contient 165µg (+ ou – 5%)
5 de protéines. La composition pharmaceutique est reconstituée avec 660µl de gel d'hydroxyde d'aluminium (2%) dilué au 10^{ème} dans du sérum physiologique dans une fiole de protéine d'où une concentration de 250µg/ml. La composition ainsi obtenue est injectée en sous-cutanée aux animaux à la même concentration. C'est ce mélange rSh28GST + hydroxyde d'aluminium qui est injecté aux
10 animaux dans tous les protocoles expérimentaux. Les doses indiquées correspondent à la dose en protéine rSh28GST.

Rapport « Arginase I/ Nitric Oxyde Synthétase 2 »

Le rapport représente le taux d'ARN messenger codant pour l'arginase I (Arg) sur le taux d'ARN messenger codant pour la nitric oxyde synthétase inductible (iNOS)
15 de type 2 pour un échantillon colique donné. Le taux d'ARN messenger est obtenu par une méthode de réaction en chaine par polymérase en temps réel (RT-PCR). Il s'agit d'une technique de biologie moléculaire d'amplification in vitro d'ADN. A chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN total est mesurée grâce à une sonde fluorescente ; la cinétique de l'ensemble des cycles d'amplification
20 permet d'obtenir une quantification de l'ARN messenger initial.

Expression de l'ARN messenger des interleukines IL-1b, IL-13, IL-5 et IL-10

La présence et la quantification de l'ARN messenger de différentes interleukines dans les tissus coliques sont obtenues en utilisant la méthode de PCR en temps réel expliquée au point précédent.

25 Résultats expérimentaux chez le rat

Trois groupes de rats Sprague Dawley sont constitués. Le groupe 1 reçoit 2 injections par voie sous cutanée d'une composition telle que précitée (rSh28GST+hydroxyde d'aluminium) à une dose de 50µg/kg (pour la protéine rSh28GST) la première à J=0 et la seconde à J=28. Le groupe 2 (« gold
30 standard ») est infesté par 2000 cercaires de *Schistosoma mansoni* à J=0. Le groupe 3 est le groupe témoin. A J=35, la colite est induite chez les rats des trois groupes par une injection intra-rectale de TNBS, puis le sacrifice a lieu à J=39.

Scores macroscopique et histologique

Comme représenté sur la figure 1, on constate que l'inflammation de la paroi intestinale des rats des groupes 1 et 2 est diminuée par rapport à celle des rats du groupe 3. De plus, le score histologique confirme le score macroscopique.

Dosage de la myéloperoxydase (MPO)

5 La myéloperoxydase est une enzyme présente dans les granulocytes neutrophiles et également un marqueur d'inflammation. Comme représenté sur la figure 2, on remarque que la quantité de MPO dans les tissus coliques des rats du groupe 1 et du groupe 2 est réduite par rapport à la quantité présente dans les tissus coliques des rats du groupe 3. Ces résultats montrent que l'injection de
10 la protéine rSh28GST permet de réduire de manière significative la sécrétion de MPO lors d'une colite inflammatoire.

Interleukines IL-1b, IL-13, IL-5 et IL-10

L'IL-1b est une interleukine sécrétée lors d'une réponse immunitaire inflammatoire de type Th1. Comme représenté sur la figure 3, on constate que la
15 quantité d'ARN messenger codant pour cette interleukine est réduite dans les tissus coliques des rats des groupes 1 et 2 (plus encore dans le groupe 1 que dans le groupe 2). Ces résultats montrent que l'injection de la protéine rSh28GST réduit la réponse immunitaire de type Th1 de manière plus prononcée que l'infection par *Schistosoma mansoni* à J0.

20 Les interleukines IL-5 et IL-13 sont sécrétées lors d'une réponse immunitaire de type Th2. Comme représenté sur la figure 3, la quantité d'ARN messenger codant pour ces deux interleukines est augmentée dans les tissus coliques des rats du groupe 1 par rapport aux tissus des rats du groupe 3. La quantité d'ARN messenger codant l'IL-5 et l'IL-13 est plus importante dans le groupe 1 que dans
25 le groupe 2. Ces résultats montrent que la protéine rSh28GST induit une forte expression de l'ARN messenger de l'IL-5 et de l'IL-13. La protéine rSh28GST permet donc d'induire une réponse immunitaire de type Th2 qui contrebalance la réponse immunitaire de type Th1 retrouvée dans le cas de la colite induite au TNBS.

30 Il a été démontré que des patients atteints de maladie de Crohn réagissaient favorablement à un traitement à base d'interleukine 10 (voir Braat H, Rottiers P, Hommes DW, Huyghebaert N, Remaut E, Remon JP, van Deventer SJ, Neiryncjk S, Peppenlenbosch MP, Steidler L (June 2006) « A phase I trial with

transgenic bacteria expressing Interleukin-10 in Crohn's disease » Clin. Gastroenterol. Hepatol.4 (6) : 754-9. doi :10.1016/j.cgh.2006.03.028. PMID 16716759). Comme représenté sur la figure 3, la présence d'ARN messenger codant pour l'IL-10 dans les tissus coliques des rats du groupe 1 est plus importante que celle des rats du groupe 2. Ces résultats montrent que la protéine rSh28GST induit la production d'ARN messenger codant pour l'IL-10, ce qui est un facteur favorable dans le cas du traitement curatif de la maladie de Crohn. Par ailleurs, l'IL-10 est sécrétée lors d'une réponse immunitaire de type Th2 ce qui concorde avec les résultats illustrés dans la Figure 3.

10 Rapport « Arginase I/ Nitric Oxyde Synthétase 2 »

L'arginase de type I est une enzyme, utilisée ici comme marqueur, qui caractérise les macrophages M2 dits alternatifs, présents dans des réactions immunitaires anti-inflammatoires Th1 ; la nitric oxyde synthétase de type 2 est elle aussi une enzyme, mais utilisée comme marqueur caractérisant les macrophages dits classiques présents dans des réactions immunitaires pro-inflammatoires Th2. Le rapport entre ces deux enzymes reflète la présence au sein des tissus coliques de tel ou tel type de macrophages, et permet d'apprécier la balance entre les deux réponses immunitaires Th1 et Th2.

Comme représenté sur la figure 4, la protéine rSh28GST permet de favoriser la réponse de type Th2 qui vient ainsi contrebalancer la réponse de type Th1 induite par la colite.

Résultats expérimentaux chez la souris.

Les 2 modèles de Rongeurs utilisés (rats et souris) sont des modèles expérimentaux classiques et largement décrits dans la littérature comme modèles de la maladie de Crohn. La souche de souris utilisée ici (C57 BL6) est plutôt pro-Th1 et donc l'obtention de résultats diminuant une réponse de type Th1 dans ce modèle animal est encore plus probante que chez le rat.

Quatre groupes de souris sont constitués. Le groupe 1 ne reçoit aucun traitement, seulement une colite au TNBS à J=35 : c'est le groupe de contrôle. Les souris du groupe 2 sont nourries à partir de J=30 avec des croquettes contenant du 5-ASA : acide 5-aminosalicylique à raison de 1 g de 5-ASA pour 600 g de croquettes, puis une colite au TNBS est induite à J=35. Les souris du groupe 3 reçoivent deux injections de composition telle que précitée (rSh28GST+

hydroxyde d'aluminium) à la dose de 1000µg/kg (pour la rSh28GST) à J0 et J28, puis une injection intra-rectale de TNBS. Les souris du groupe 4 ne reçoivent qu'une injection intra-rectale d'éthanol à 50% à J35.(Contrôle Solvant du TNBS). Les souris des quatre groupes sont sacrifiées à J=37.

5 Score macroscopique et histologique

Comme représenté sur la figure 5, le score macroscopique qui reflète l'inflammation est fortement diminué chez les souris du groupe 3. Les résultats obtenus sont meilleurs que ceux obtenus avec le 5-ASA. Le score histologique confirme le score macroscopique.

10 Dosage de la myéloperoxidase (MPO)

La figure 6 montre que la rSh28GST diminue, dans le cas d'une colite, le taux de MPO au niveau des tissus coliques des souris du groupe 3. Dans le cas où les souris n'ont pas reçu de colite (groupe 4), l'activité de la MPO est inchangée.

Interleukines IL-1b, IL-13, IL-5 et IL-10

15 Les figures 7 à 9 confirment, chez la souris, les résultats obtenus chez le rat. La protéine rSh28GST réduit le taux d'ARN messager codant pour l'IL-1b et augmente celui de l'IL-13 et de l'IL-5 en cas de colite. La protéine précitée semble donc avoir un effet préventif du fait de l'augmentation de la production d'IL-10.

20 Rapport « Arginase de type I/Nitric Oxyde Synthétase 2 »

La figure 10 montre, comme dans le cas du rat, une augmentation du rapport du taux d'ARN messager codant pour l'arginase de type I sur celui codant pour la nitric oxyde synthétase 2 dans le cas du groupe 3 par rapport aux groupes 1, 2 et 4. Cette augmentation du rapport « Arginase de type I/Nitric Oxyde Synthétase 2 » est significative d'une augmentation de la présence de macrophages associés à une réponse Th2. La composition de l'invention permet donc de favoriser une réponse de type Th2 dans le cas de la colite induite, ce qui n'est pas le cas de l'acide 5-aminosalicylique (voir groupe 2).

Par ailleurs, un autre groupe de souris a subi les deux injections de rSh28GST tel que précité et une simple injection intra-rectale d'éthanol à la place du TNBS. On teste ainsi l'influence de la protéine sans inflammation. Dans ce groupe, dont les résultats ne sont pas illustrés sur les figures, l'activité de la MPO est inchangée. La protéine de l'invention réduit donc l'inflammation mais ne modifie

pas les taux de MPO lorsqu'il n'y a pas d'inflammation induite. Les résultats de ce groupe montrent aussi que, sans inflammation induite, la protéine seule permet d'augmenter l'ARN messenger codant pour l'IL-13, l'IL-5 et l'IL-10 et que sans inflammation induite, la protéine est sans activité sur les macrophages.

5 **Modèle de la sclérose en plaques**

Le modèle utilisé est le modèle de l'encéphalite allergique expérimentale (EAE). Dans le cas présent, l'EAE est induite par une injection de protéine basique de la myéline (MBP).

10 L'effet de l'immunisation par la rSh28GST sur le développement de l'EAE induite par la MBP dans un modèle de rats Lewis a été étudié.

Matériels et méthodes :

1- Réactifs :

a) Préparation de rSh28GST(alum): (Lot : GLP. Désigné par : L-Bix-P08/165a). Le terme « alum » désigne une suspension aqueuse d'hydroxyde d'aluminium comme décrit plus en détails ci-dessous.

Dose de 5µg/kg (+ alum) :

On dissout 1 fiole contenant 165µg de rSh28GST dans 660µl d'eau physiologique pour obtenir une solution de 250 µg/ml. On prépare ensuite une solution à 10 µg/ml : dilution au 1:25ème en eau physiologique. On ajoute l'alum :
20 10 µl (« alum » désigne alhydrogel 2% VacciGrade_50 ml cat : vac-alu-50 lot : AHG-33-427)

Dose de 0,5 µg/kg (+ alum) :

A partir de la solution de rSh28GST à 250 µg/ml, on prépare une solution à 1 µg/ml : dilution au 1:250ème en eau physiologique. On ajoute l'alum : 10 µl
25 (alum désigne alhydrogel 2% VacciGrade_50 ml cat : vac-alu-50 lot : AHG-33-427)

b) Dose alum :

La dose d'alum est obtenue en diluant 10 µl d'alum à 2,5 ml d'eau physiologique (l'alum désigne alhydrogel 2% VacciGrade_50 ml cat : vac-alu-50
30 lot : AHG-33-427)

c) Préparation de l'émulsion destinée à induire l'EAE

On prépare une solution à 100 µg/ml, soit 3 ml de CFA à 2 mg/ml + 1 ml de IFA + 4 ml d'une solution MBP à 200 µg/ml dans du PBS. Deux doses de 8 ml

équivalent à 50 µl/5 µg de MBP sont injectées au niveau des pattes du rat. Au total, on injecte 100 µl/10µg MBP par rat.

La solution de MBP dans du PBS précitée est obtenue par dilution de MBP (lot 2011) : 1064 µl à 940 µg/ml dans 3,94 ml de perborate de sodium (PBS).

5 CFA désigne l'adjuvant complet de Freund c'est-à-dire comprenant des mycobactéries (*M. tuberculosis*). IFA désigne la forme incomplète de l'adjuvant de Freund. 1 mL d'adjuvant de Freund dans sa forme incomplète est constitué de 0.85 mL d'huile de paraffine et 0.15 mL monooleate de mannide. Dans sa forme complète, il comprend en outre une quantité donnée de *Mycobacterium*
10 *tuberculosis* (H37Ra, ATCC 25177) thermo-inactivé (tué thermiquement) et séché.

CFA à 2 mg/ml de *M. tuberculosis* : IFA Sigma (réf. F5506 lot : 070M8706) et *Mycobacterium tuberculosis* H37 RA Difco (réf. 3114-25 lot. 131582 L-00535-02) de manière à obtenir la concentration de 2mg/ml précitée.

15 Anesthésiques fournis par la zootechnie : kétamine et xylazine

d. Animaux :

Rats mâles Lewis âgés de 6 semaines (CERJ élevage Janvier) au début des expériences et immunisés par la MBP à 12 semaines (n=10 rats/groupe). Les injections sont effectuées en sous-cutanée dans le cou du rat. 40 rats ont été
20 utilisés.

Protocole expérimental

L'expérimentation débute à la septième semaine de vie des rats.

A J=0 les 10 rats du groupe A reçoivent une injection de la solution précitée contenant 5 µg/kg de rSh28GST et de l'alum. A J=0 les 10 rats du groupe B
25 reçoivent une injection de la solution précitée contenant 0,5 µg/kg de rSh28GST et de l'alum. A J=0 les 10 rats du groupe C reçoivent une injection de la solution alum précitée seule ; ils reçoivent une seconde injection d'alum seul à J=28. A J=0 les 10 rats du groupe D qui est le groupe de contrôle ne reçoivent aucune injection. A J=28, les rats des groupes A et B reçoivent une 2ème injection de
30 rSh28GST(alum) au même dosage que la première injection

A J=35, on induit l'EAE par une injection contenant de la protéine de base de la myéline (voir paragraphe c)). L'étude clinique débute à J44 et se termine à J56 par le sacrifice des animaux.

Réponse humorale des rats immunisés par la P28 GST

Le dosage des anticorps IgG anti-rSh28GST a été réalisé sur les prélèvements sanguins effectués à J35 (jour de l'induction de l'EAE) et J56 (jour du sacrifice) par technique Elisa. Les résultats révèlent que seuls 6 rats (sur 10) du groupe A et 4 rats (sur 10) du groupe B ont présenté une réponse immunitaire détectable tout au long du protocole clinique. Seuls ces rats présentant une réponse immune sous forme de production détectable d'anticorps IgG anti-rSh28GST à la rSh28GST à J35 et à J56 ont été inclus dans l'étude qui suit concernant les poids des rats..

Etude des variations du poids des rats dans les quatre groupes

Le poids des animaux a été évalué le jour de l'induction de l'EAE (soit 35 jours après la première injection de rSh28GST et tous les jours à partir des premiers symptômes (J42). Les résultats obtenus indiquent qu'une perte poids d'environ 10% pour tous les groupes est observée au moment de l'acmé de la maladie.

Néanmoins, des tests statistiques non paramétriques ont été effectués sur ces données et ont mis en évidence des différences significatives entre les groupes. Ainsi, à J35, les rats des groupes A et B (quelle que soit la dose de P28GST) présentent un poids significativement plus important par rapport aux rats des groupes C et D.

Ces résultats sont visibles sur la fig. 11 qui représente l'analyse des poids des différents groupes de rats à J35. Les résultats sont présentés sous forme de box-and-whisket plots. Les tests statistiques de Kruskal-Wallis et Mann Whitney ont été réalisés afin de déterminer les différences significatives entre les rats des différents groupes. * $P < 0.05$.

De plus, il apparaît qu'à J42 et à J48, les rats malades du groupe D présentent une masse corporelle inférieure à ceux des rats des groupes A et B.

La fig. 12 représente l'analyse des poids des différents groupes de rats à J42. La fig. 13 représente l'analyse des poids des différents groupes de rats à J48. Pour les deux figures, les résultats sont présentés sous forme de box-and-whisket plots. Les tests statistiques de Kruskal-Wallis et Mann Whitney ont été utilisés pour déterminer les différences significatives entre les rats ayant reçu 2 doses de rSh28GST(Alum) à 5µg/kg, 0.5 µg/kg, alum seul et témoin. * $P < 0.05$.

Scores Cliniques

Pour l'évaluation du score clinique, d'autres groupes de rats ont été utilisés (n=22 pour le groupe A, n=24 pour le groupe C et n=8 pour le groupe D). Le protocole est le même que précité à la différence que les rats du groupe A ont reçu trois injections (respectivement à J0, J14 et J28) de 5µg/Kg de rSh28GST en combinaison avec de l'hydroxyde d'aluminium (alum) (de manière à obtenir une réponse immune) et que les rats du groupe C ont reçu trois injections (à J0, J14 et J28) d'alum seul. L'EAE a été induite à J35. Les rats ont été scorés quotidiennement à partir des premiers symptômes (J44) jusqu'en fin de phase de rémission (J55). Des scores cliniques ont été attribués selon l'échelle de référence suivante : score de 0 = aucun symptôme ; score de 0.5 = faiblesse musculaire dans la queue ; score de 1 = queue hypotonique ; score de 2 = queue hypotonique + faiblesses musculaires dans les membres postérieurs ; score de 3 = 1 membre postérieur paralysé ; score de 4 = 2 membres postérieurs paralysés, score 5 = les 2 membres postérieurs paralysés + une incapacité à se nettoyer et score de 6 = mort de l'animal. Ainsi, la Fig. 14 représente les scores cumulés observés pour les différents groupes de rats précités en fonction de la durée post immunisation par la rSh28GST. Les groupes sont représentés en abscisse tandis que le score cumulé est indiqué en ordonnée. Les rats du groupe A débutent la poussée à J44 avec une acmé atteinte à J46 suivant la même cinétique que les groupes C et D mais les scores cumulés à partir de J45 sont moins importants que ceux des groupes C et D, notamment entre J45 et J55. Les diminutions du score cumulé sont significatives à J45 et J48. Les rats ayant développé une réponse anticorps à la dose de 5 µg/ kg (groupe A) manifestent donc une diminution des scores cliniques cumulés. Par ailleurs, la mortalité dans le groupe A est nulle, tandis qu'un rat du groupe contrôle D est mort ainsi que trois rats du groupe C (alum seul).

REVENDICATIONS

1. Produit choisi parmi une protéine, un fragment de ladite protéine, une séquence dérivée et une séquence homologue de ladite protéine, caractérisé en ce que :

- ladite protéine comprend ou est constituée par la protéine 28KDa Glutathion S-transférase d'un schistosome choisi parmi *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma bovis* représentée respectivement par les séquences SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 2, et SEQ ID NO : 3 ;

- ledit fragment est un fragment d'une desdites protéines sous réserve qu'il induise une réponse immunitaire de type Th2 et/ou diminue la réponse de type Th1, ledit fragment comportant, au moins une région comprise parmi les régions suivantes : la région comprise de l'acide aminé en position 15 à l'acide aminé en position 60, la région comprise de l'acide aminé en position 20 à l'acide aminé en position 50, la région comprise de l'acide aminé en position 24 à l'acide aminé en position 43, la région comprise de l'acide aminé en position 170 à l'acide aminé en position 220, notamment la région comprise de l'acide aminé en position 180 à l'acide aminé en position 215, de préférence la région comprise de l'acide aminé en position 190 à l'acide aminé en position 211 de la séquence SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 2 ou SEQ ID NO : 3 ;

- ladite séquence dérivée est dérivée d'une desdites séquences SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 2 et SEQ ID NO : 3 ou d'un desdits fragments précités et obtenue notamment par suppression, substitution ou ajout d'un ou plusieurs acides aminés, dans la séquence SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 2 ou SEQ ID NO : 3, ladite séquence dérivée comprenant au moins une région comprise parmi les régions suivantes : la région comprise de l'acide aminé en position 15 à l'acide aminé en position 60, la région comprise de l'acide aminé en position 20 à l'acide aminé en position 50, la région comprise de l'acide aminé en position 24 à l'acide aminé en position 43, la région comprise de l'acide aminé en position 170 à l'acide aminé en position 220, la région comprise de l'acide aminé en position 180 à l'acide aminé en position 215 et la région comprise de l'acide aminé en position 190 à l'acide aminé en position 211 de la séquence SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 2 ou SEQ ID NO : 3 ; ceci entraînant l'induction d'une réponse Th2 et/ou la diminution de la réponse Th1 ; et

- ladite séquence homologue est une séquence homologue d'une desdites séquence SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 2 et SEQ ID NO : 3 ou d'un desdits fragments, et présente une identité d'au moins 80% et notamment d'au moins 85% avec au moins l'une des régions suivantes desdites séquences : la région comprise de l'acide aminé en position 15 à l'acide aminé en position 60, la région comprise de l'acide aminé en position 20 à l'acide aminé en position 50, la région comprise de l'acide aminé en position 24 à l'acide aminé en position 43, la région comprise de l'acide aminé en position 170 à l'acide aminé en position 220, la région comprise de l'acide aminé en position 180 à l'acide aminé en position 215, et la région comprise de l'acide aminé en position 190 à l'acide aminé en position 211 de la séquence SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 2 ou SEQ ID NO : 3 ; ou avec la totalité de l'une des séquences SEQ ID NO : 1, SEQ ID NO : 2 ou SEQ ID NO : 3 ; ceci entraînant l'induction d'une réponse Th2 et/ou la diminution de la réponse Th1.

pour son utilisation dans le traitement préventif et/ou curatif d'une maladie inflammatoire chronique liée à un dérèglement du système immunitaire générant une réponse immunitaire de type Th1/Th17.

2. Produit selon la revendication 1, pour son utilisation dans le traitement de la maladie selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite protéine est représentée par la séquence SEQ ID NO : 1 (28 GST glutathion transférase de *Schistosoma haematobium*), ledit fragment est un fragment de ladite protéine comprenant la région comprise de l'acide aminé en position 15 à l'acide aminé en position 60, notamment la région comprise de l'acide aminé 20 à l'acide aminé 50, de préférence la région comprise de l'acide aminé en position 24 à l'acide aminé en position 43 et la région comprise de l'acide aminé en position 170 à l'acide aminé en position 220, notamment la région comprise de l'acide aminé en position 180 à l'acide aminé en position 215, de préférence la région comprise de l'acide aminé en position 190 à l'acide aminé en position 211, ladite séquence dérivée est obtenue à partir de SEQ ID NO : 1 et ladite séquence homologue présente une identité d'au moins 80% et notamment d'au moins 85% avec la séquence SEQ ID NO : 1.

3. Produit selon la revendication 2, pour son utilisation selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est le produit d'expression d'une séquence nucléotidique codant :

- pour la protéine 28KDa Glutathion-S-transferase représentée par SEQ ID NO : 1 ; ou

- pour un fragment de ladite protéine représentée par SEQ ID NO : 1, ledit fragment comportant ou étant constitué d'au moins la région comprise de l'acide aminé en position 15 à l'acide aminé en position 60, notamment la région comprise de l'acide aminé en position 20 à l'acide aminé en position 50, de préférence la région comprise de l'acide aminé en position 24 à l'acide aminé en position 43 et la région comprise de l'acide aminé en position 170 à l'acide aminé en position 220, notamment la région comprise de l'acide aminé en position 180 à l'acide aminé en position 215, de préférence la région comprise de l'acide aminé en position 190 à l'acide aminé en position 211 de la séquence SEQ ID NO : 1 ; ou

- pour une desdites séquences dérivées ; ou

- pour une desdites séquences homologues ;

ladite séquence nucléotidique correspondant à la séquence SEQ ID NO : 4 codant pour SEQ ID NO : 1.

4. Produit selon la revendication 3, pour son utilisation selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est le produit d'expression de ladite séquence codante SEQ ID NO : 4 dans *Saccharomyces cerevisiae* ou dans *Escherichia coli*.

5. Produit selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, pour son utilisation selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite maladie est choisie parmi les maladies inflammatoires auto-immunes comprenant la maladie de Berger, la maladie de Basedow, la thyroïdite d'Hashimoto, le myxoedème primaire, la maladie coéliqua, la rectocolite hémorragique, la maladie de Crohn, l'arthrite rhumatoïde, la cirrhose biliaire primitive, la cholangite sclérosante primitive, les anémies hémolytiques auto-immunes, l'anémie de Biermer (Anémie pernicieuse), le lupus érythémateux, le syndrome de CREST, le diabète de type 1, la sclérodermie, le pemphigus vulgaire, la pemphigoïde bulleuse, l'épidermolyse Bulleuse Acquisée, la dermatite herpétiforme, la myasthénie, le syndrome myasthénique de Lambert-Eaton, la polymyosite, le syndrome de Goujerot-Sjögren, la sclérose en plaques, la polyarthrite rhumatoïde, la maladie de Graves et le psoriasis.

6. Produit selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, pour son utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 et 5, plus particulièrement chez un enfant.
7. Composition pharmaceutique pour son utilisation selon l'une quelconque des revendications 1, 5 et 6, ladite composition comprenant, en tant qu'agent actif, un produit selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et un excipient pharmacologiquement acceptable.
8. Composition pharmaceutique selon la revendication 7, pour son utilisation dans le traitement préventif et/ou curatif d'une maladie choisie parmi les maladies inflammatoires auto-immunes comprenant la maladie de Berger, la maladie de Basedow, la thyroïdite d'Hashimoto, le myxoedème primaire, la maladie coéliquaue, la rectocolite hémorragique, la maladie de Crohn, l'arthrite rhumatoïde, la cirrhose biliaire primitive, la cholangite sclérosante primitive, les anémies hémolytiques auto-immunes, l'anémie de Biermer (Anémie pernicieuse), le lupus érythémateux, le syndrome de CREST, le diabète de type 1, la sclérodermie, le pemphigus vulgaire, la pemphigoïde bulleuse, l'épidermolyse Bulleuse Acquise, la dermatite herpétiforme, la myasthénie, le syndrome myasthénique de Lambert-Eaton, la polymyosite, le syndrome de Goujerot-Sjögren, la sclérose en plaques, la polyarthrite rhumatoïde, la maladie de Graves et le psoriasis et en particulier les éventuelles formes pédiatriques de ces maladies.
9. Composition pharmaceutique selon la revendication 7 ou 8, pour son utilisation selon l'une quelconque des revendications 1, 5 et 6, caractérisée en ce qu'elle comprend un adjuvant choisi parmi les sels d'aluminium et en particulier l'hydroxyde d'aluminium.
10. Composition selon la revendication 9, pour son utilisation selon l'une quelconque des revendications 1, 5 et 6, caractérisée en ce que la concentration en adjuvant est comprise de 0,5 mg/ml à 2 mg/ml, notamment de 0,3 mg/ml à 1 mg/ml et en particulier de 220 µg/ml à 280 µg/ml et de préférence sensiblement égale à 250 µg/ml.

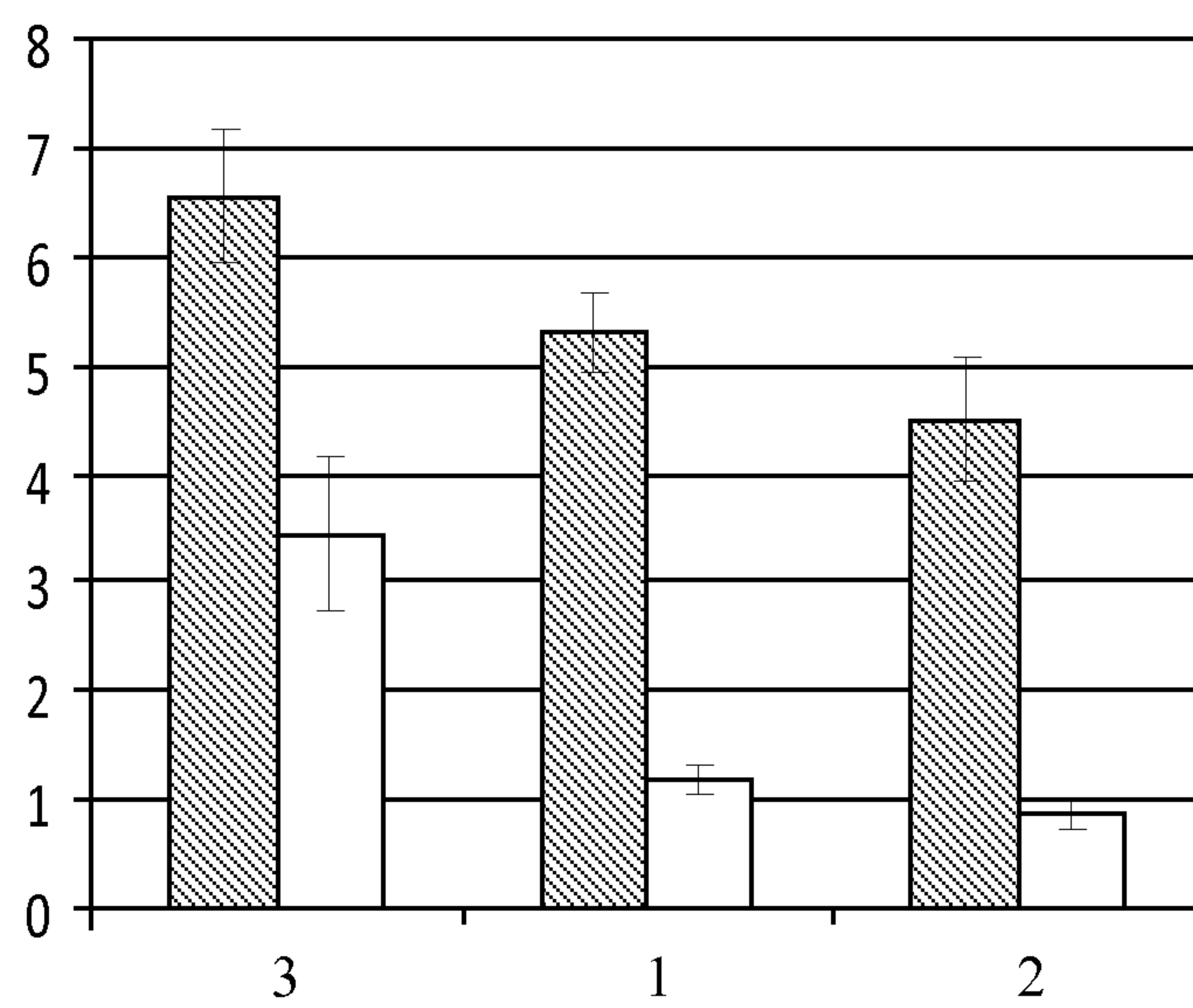
FIGURE 1

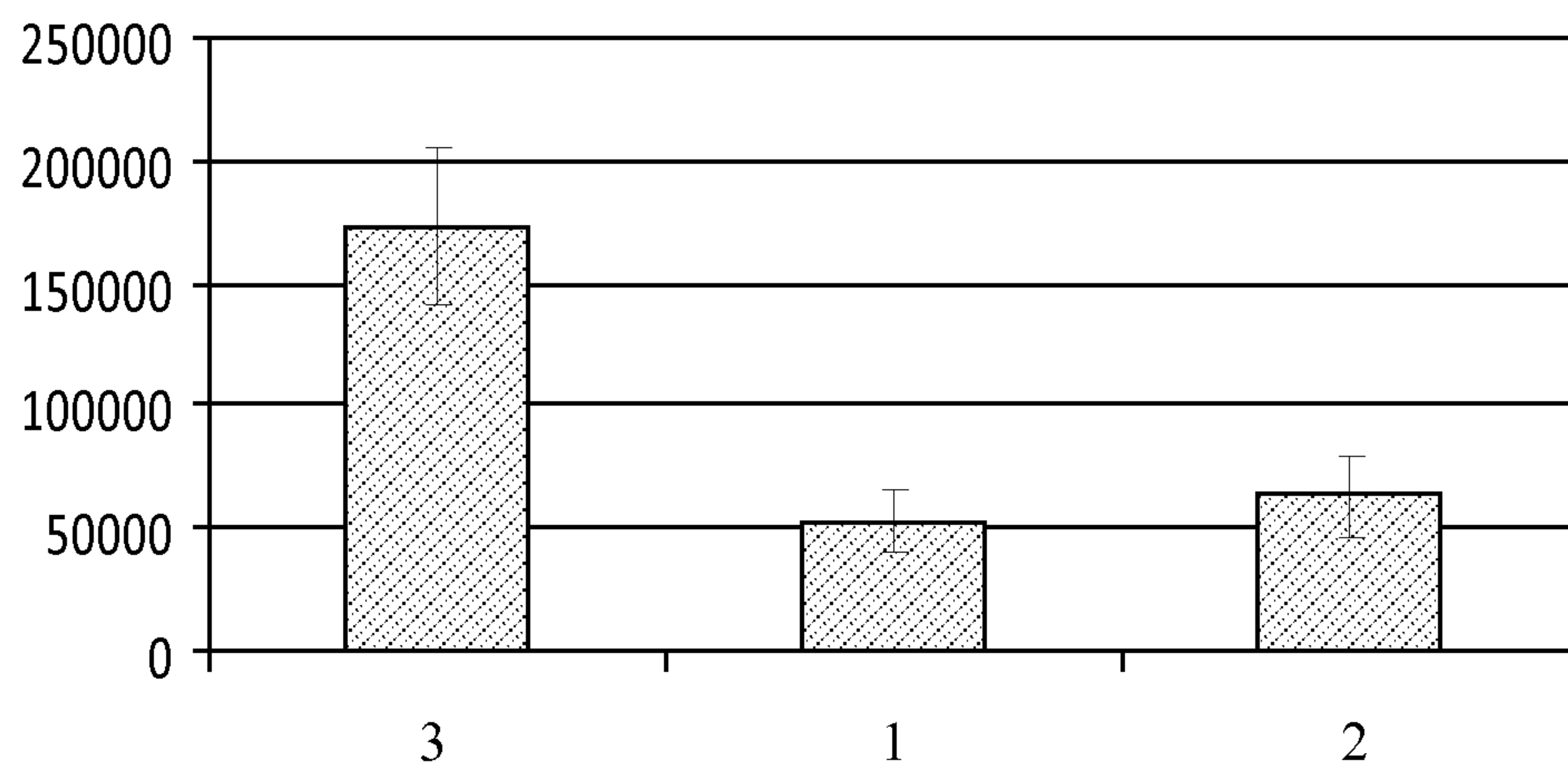
FIGURE 2

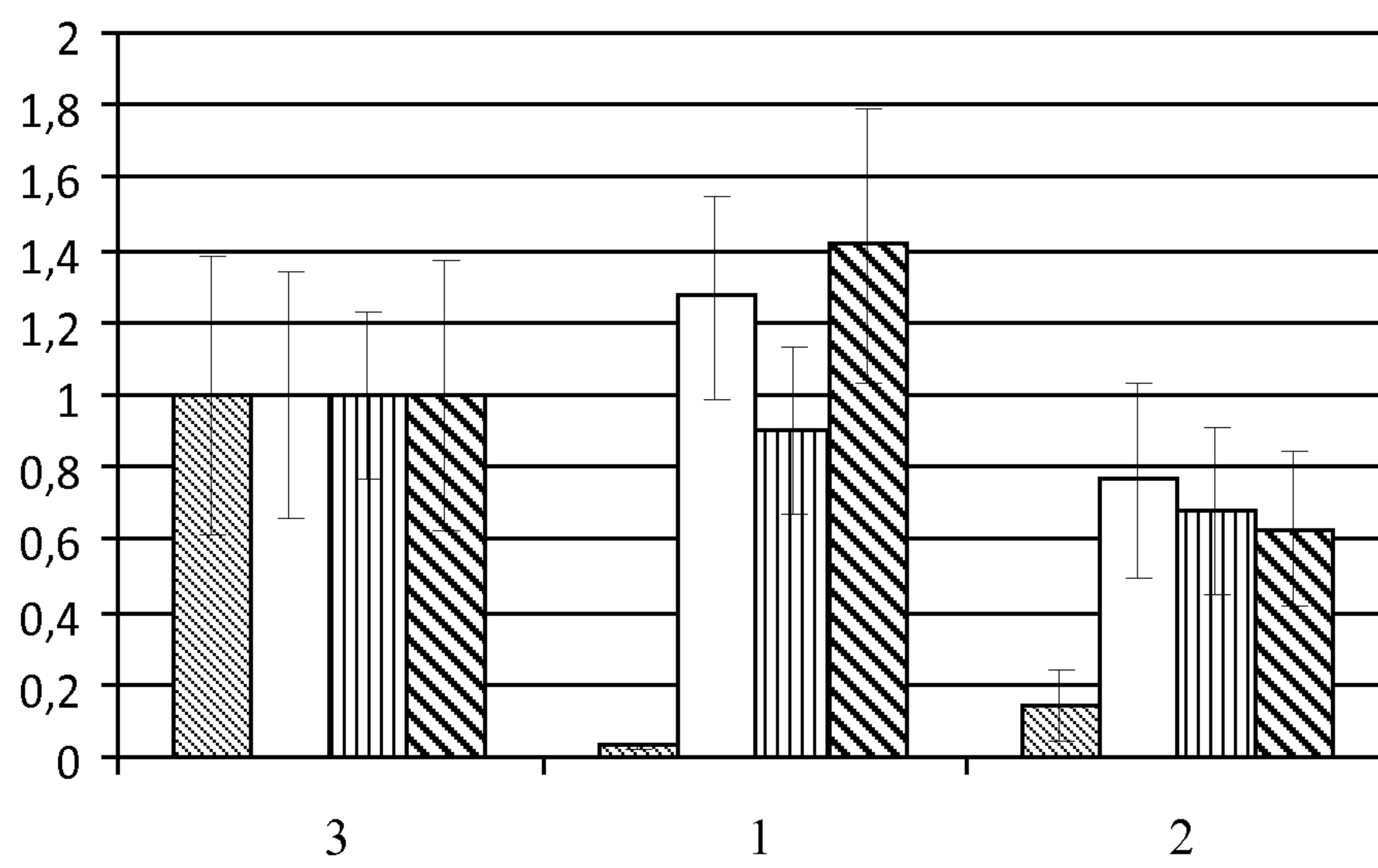
FIGURE 3

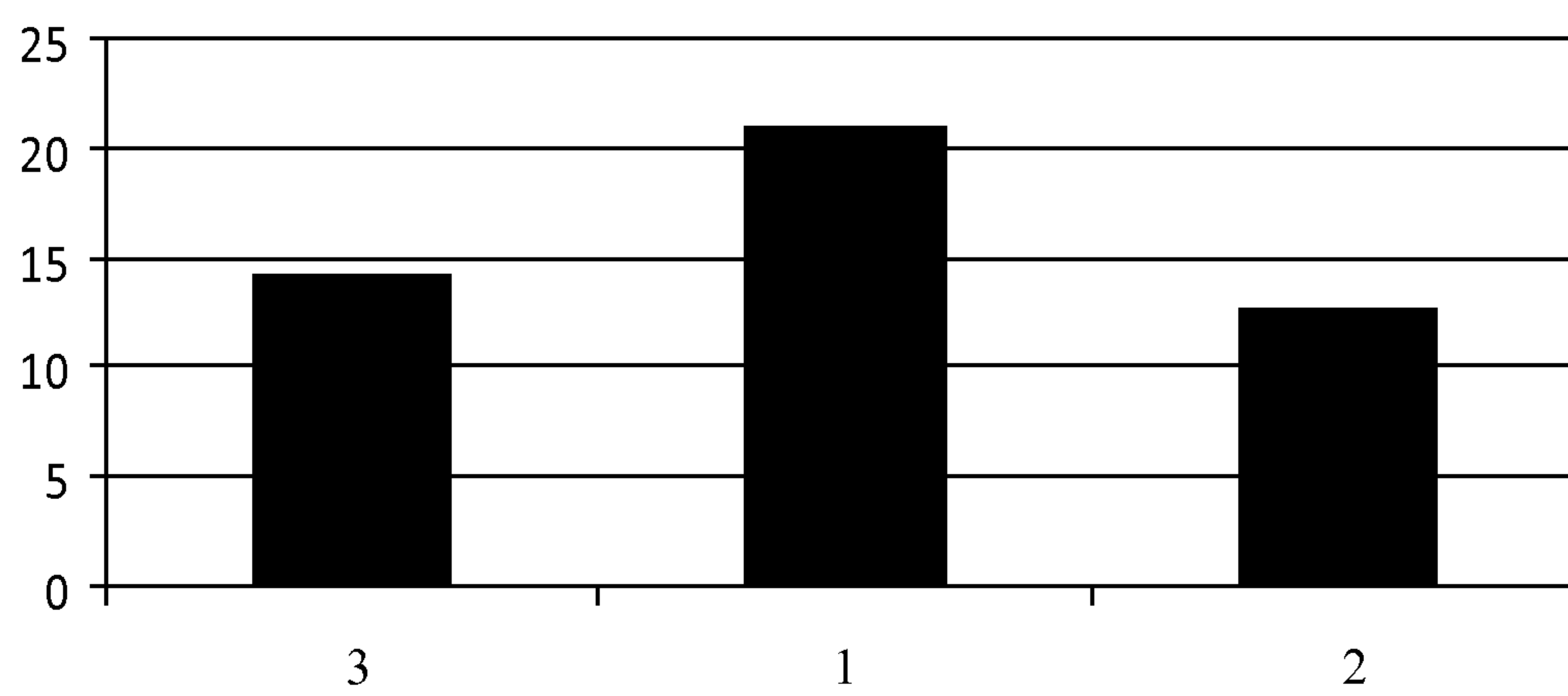
FIGURE 4

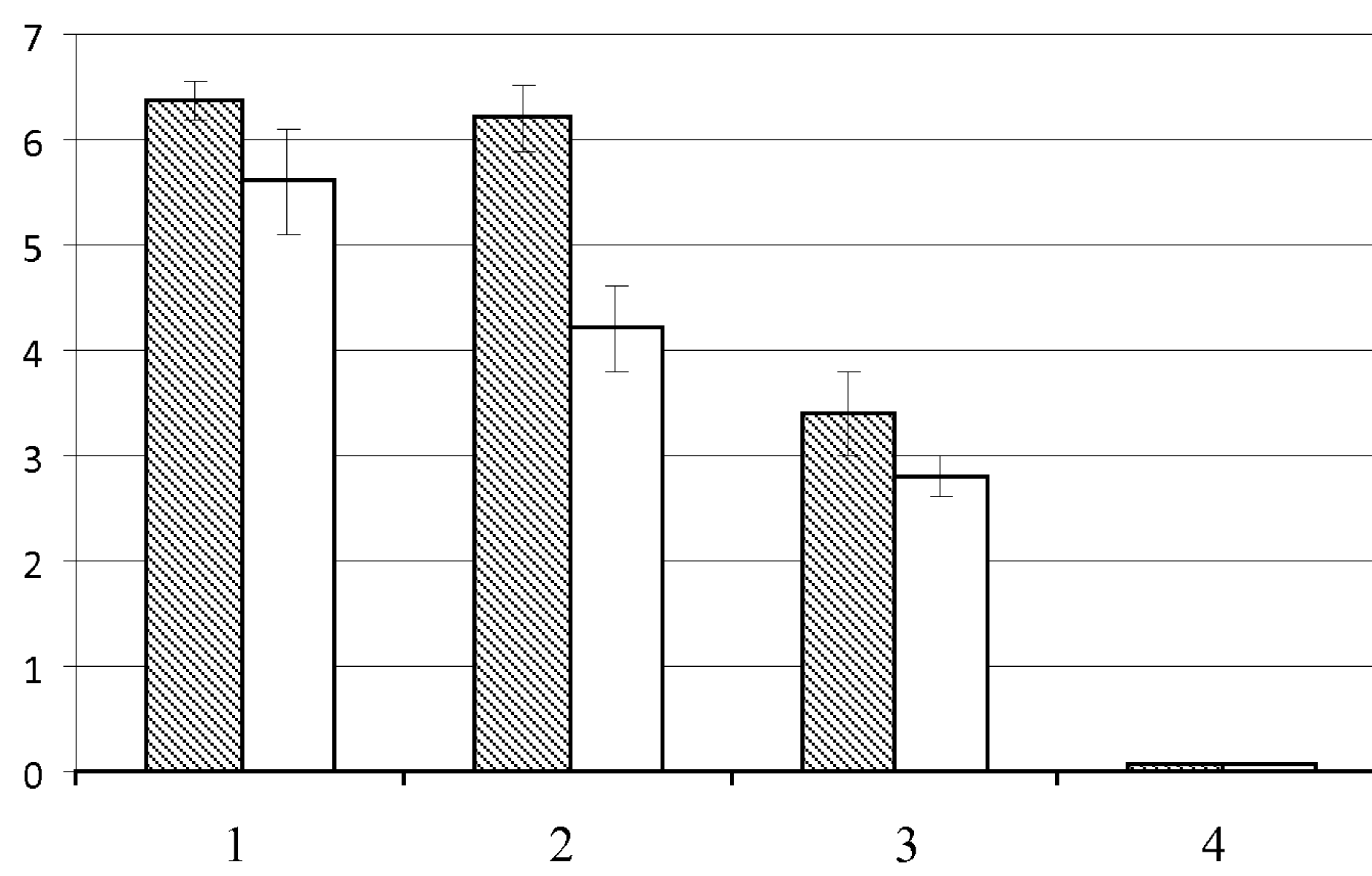
FIGURE 5

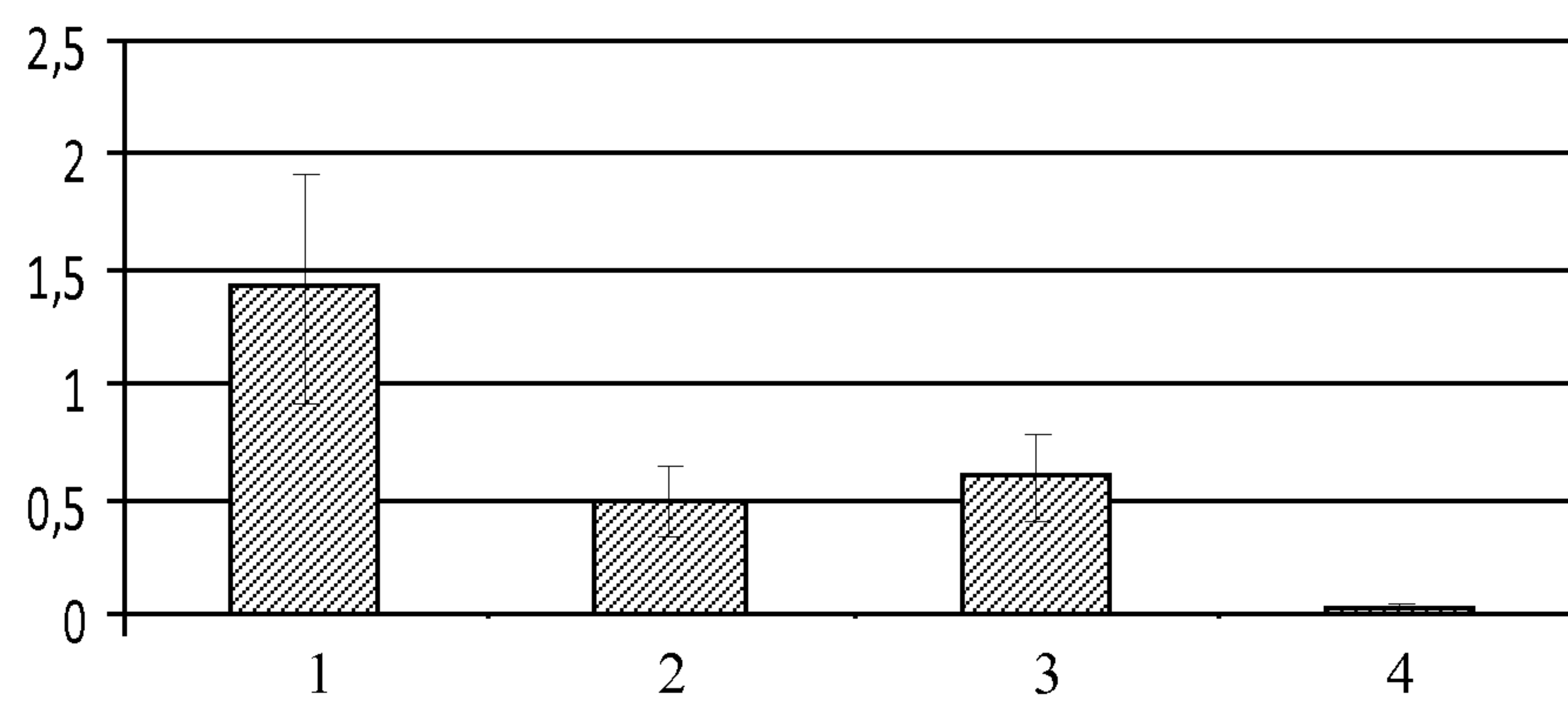
FIGURE 6

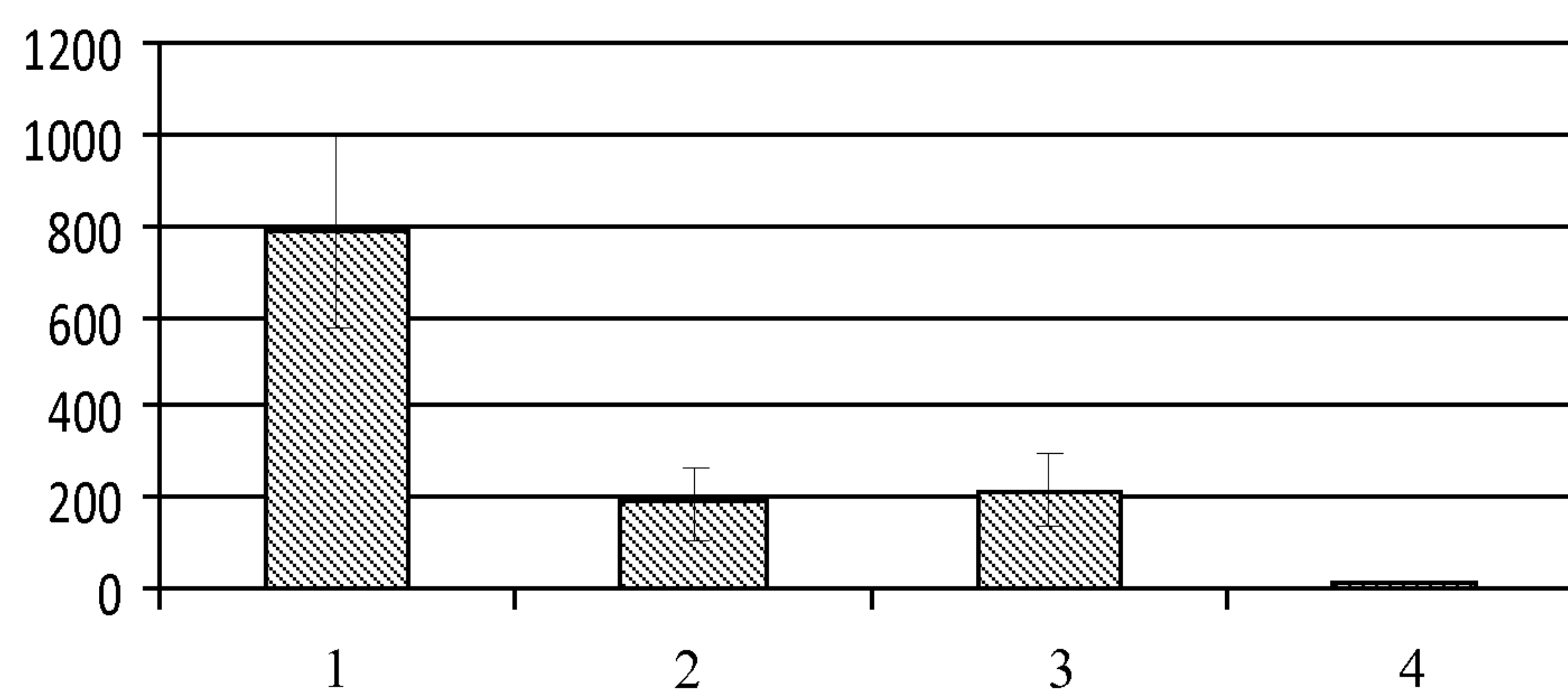
FIGURE 7

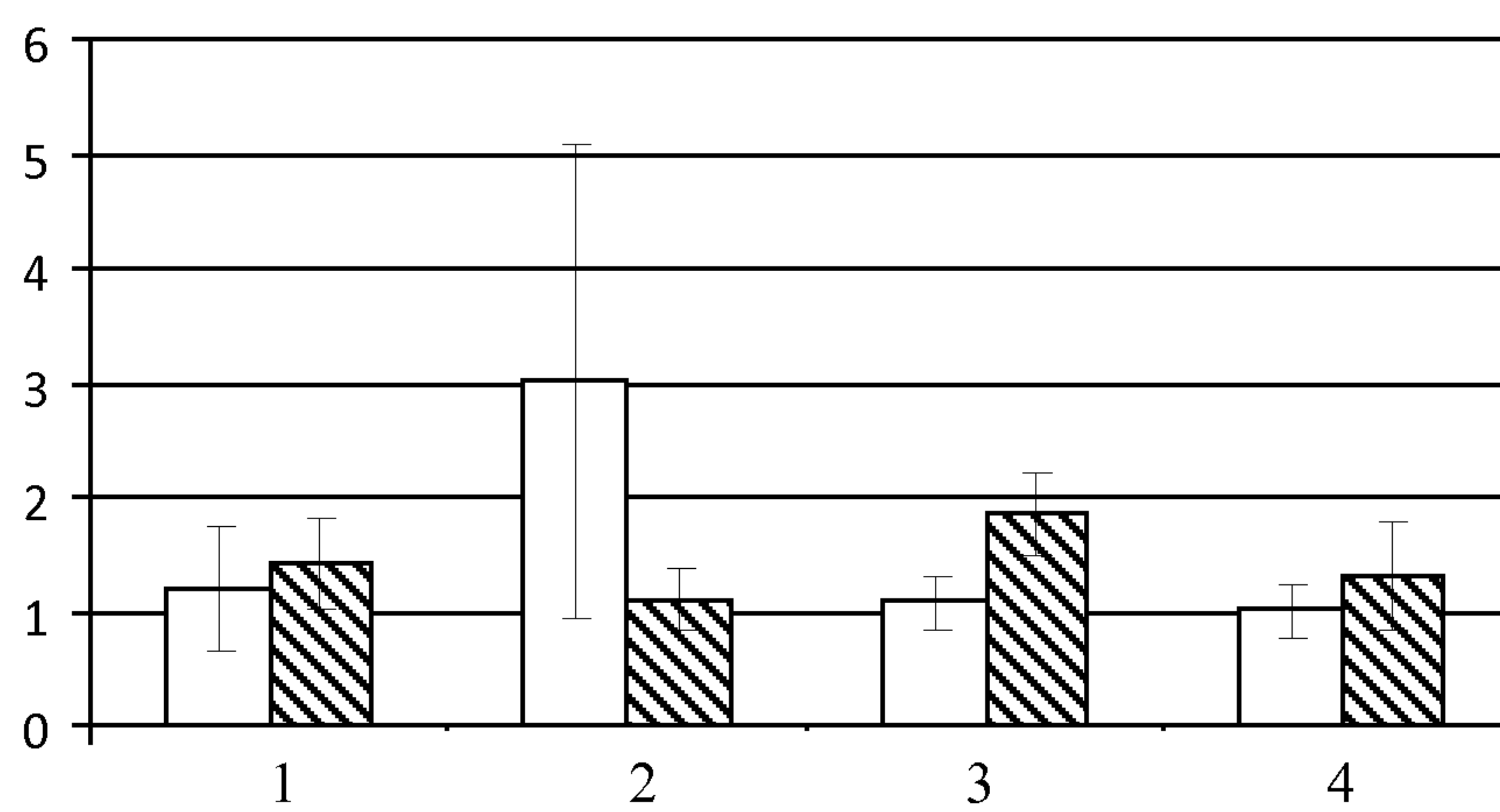
FIGURE 8

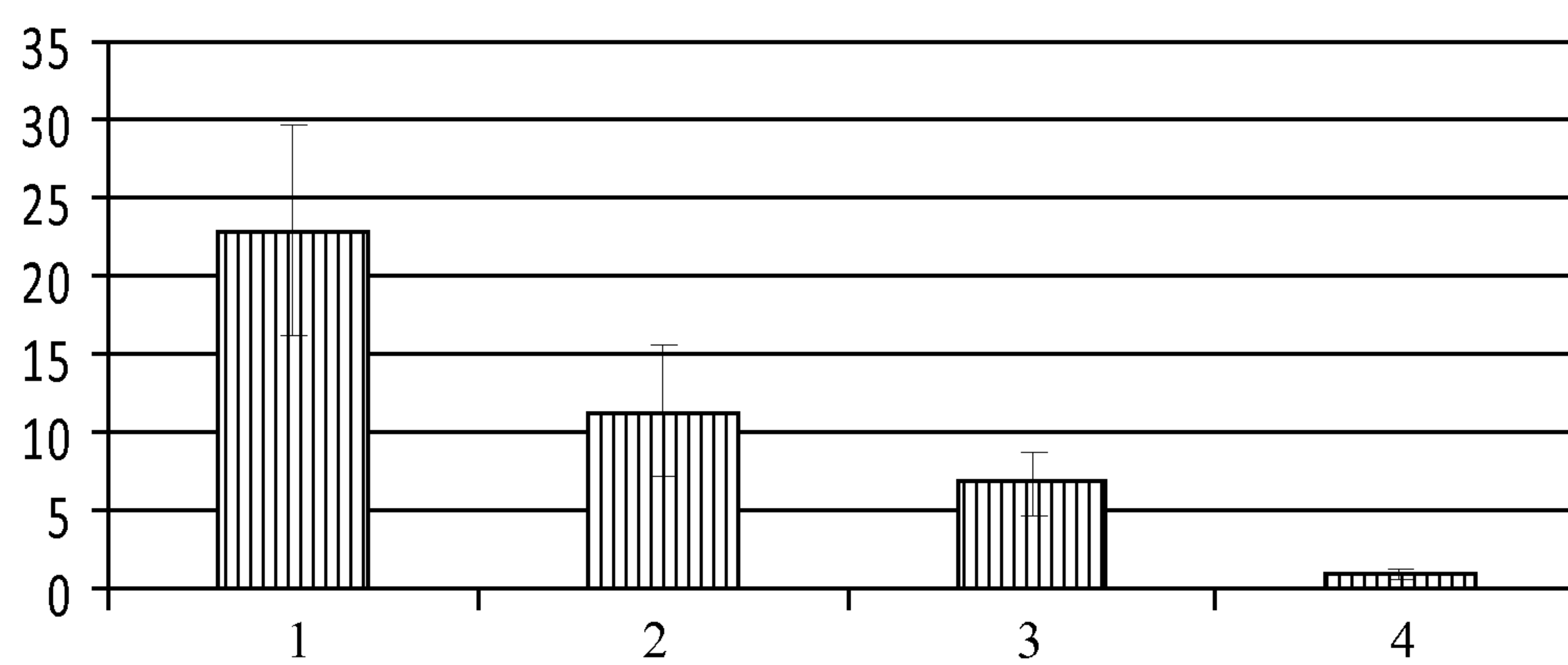
FIGURE 9

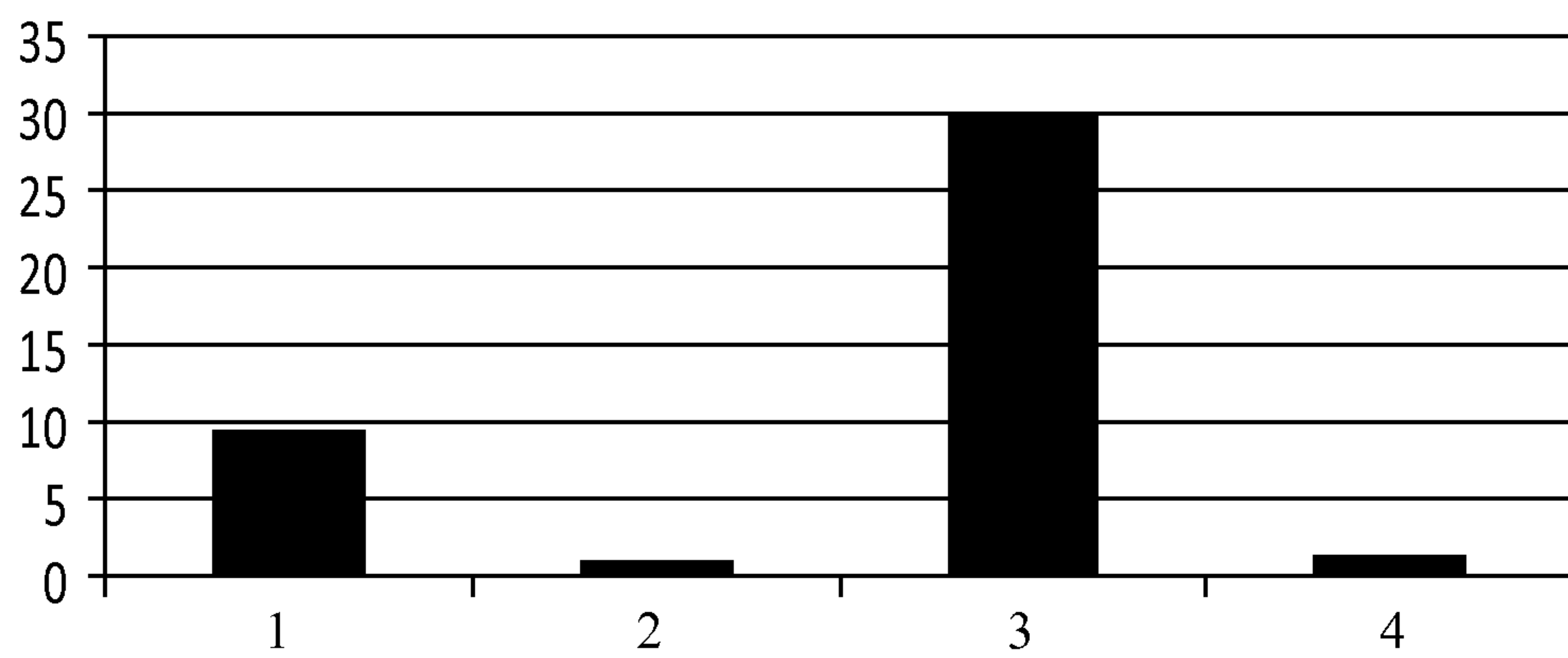
FIGURE 10

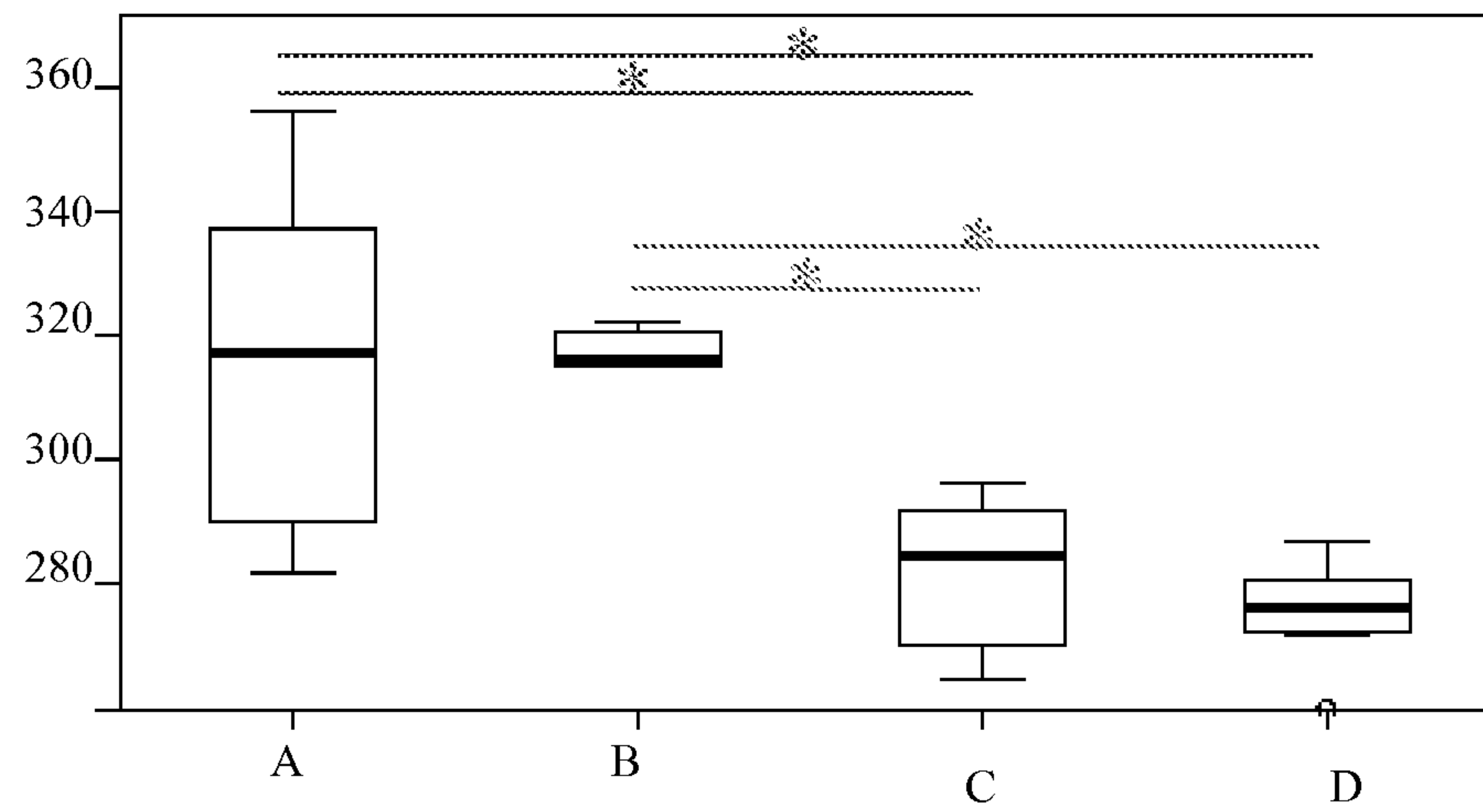
FIGURE 11

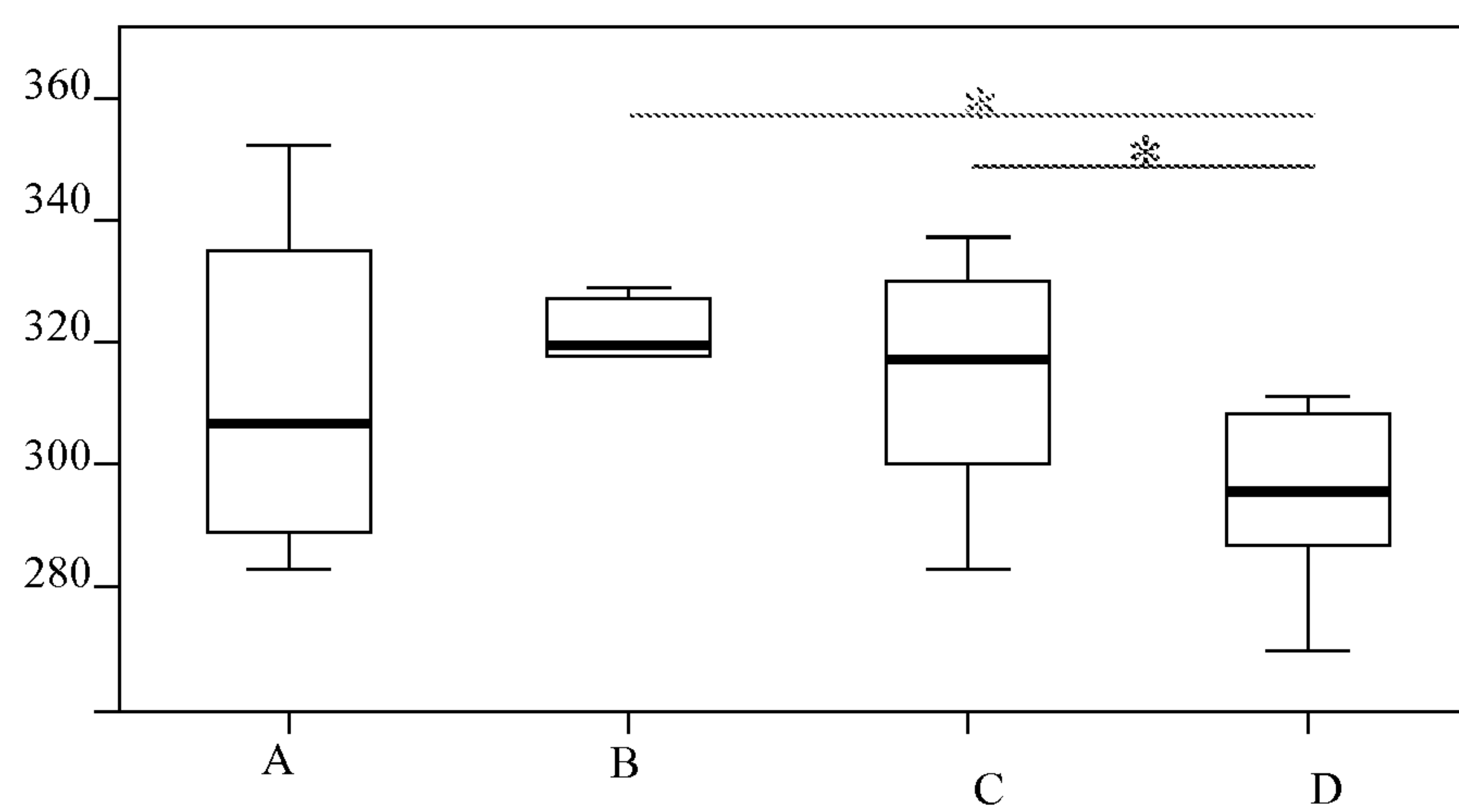
FIGURE 12

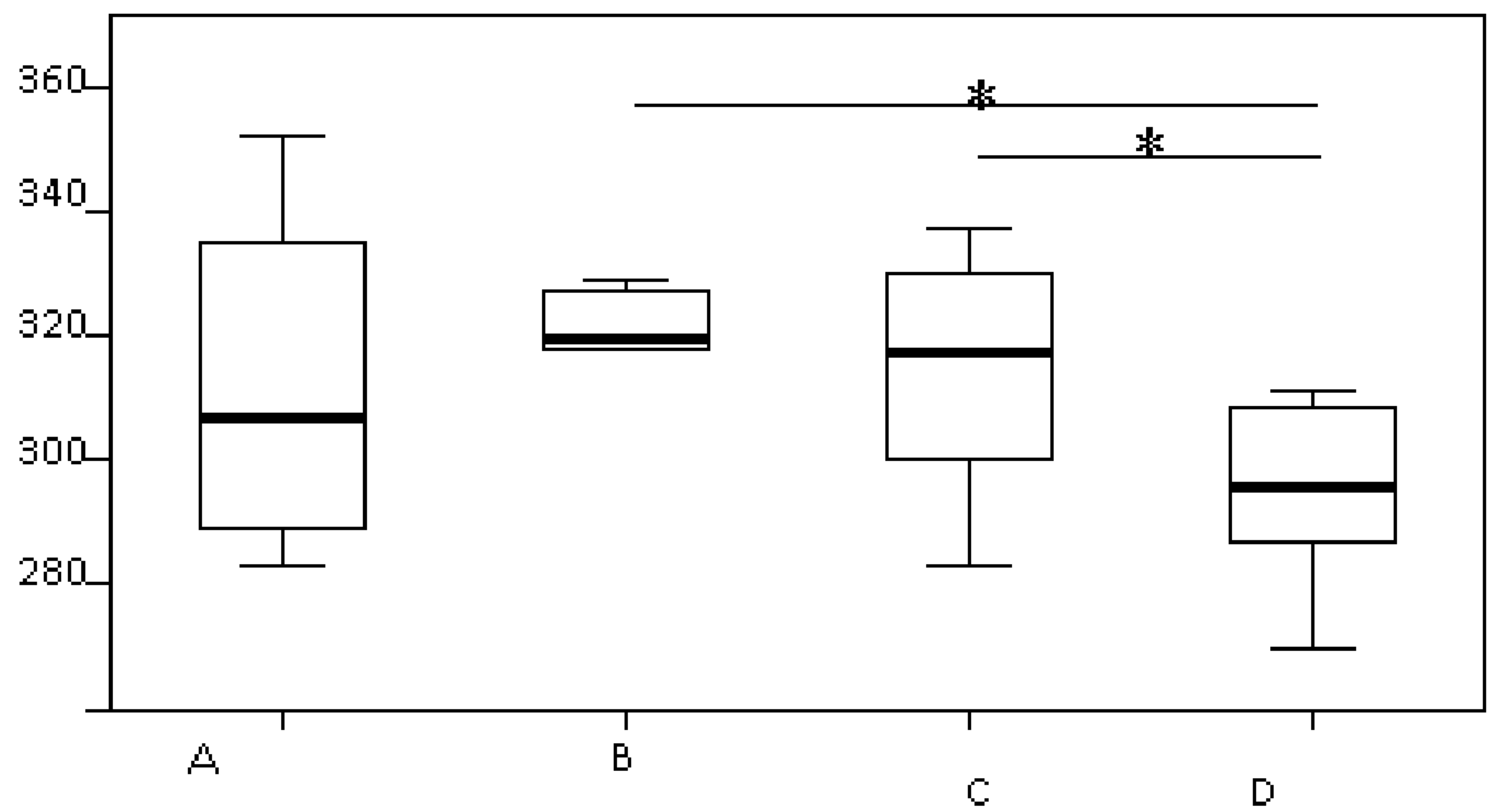
FIGURE 13

FIGURE 14