Anticorps humanisés spécifiques de la forme protofibrillaire du peptide béta-amyloïde

La présente invention a pour objet des anticorps humanisés spécifiques de la forme protofibrillaire du peptide β-amyloïde. La présente invention a également pour objet l'utilisation thérapeutique, diagnostique et/ou préventive de ces anticorps, en particulier associée au déclenchement et à la progression de troubles neurodégénératifs et/ou aux maladies liées au dépôt de plaques amyloïdes, et notamment de la maladie d'Alzheimer.

La maladie d'Alzheimer (AD) est une maladie neurodégénérative progressive qui affecte une large proportion de la population âgée. Cette maladie est caractérisée sur le plan clinique par une perte de la mémoire et un déclin des fonctions cognitives, sur le plan neuropathologique par la présence dans le cerveau de dépôts neurofibrillaires intracellulaires et de dépôts extracellulaires du peptide β-amyloïde (A-β) formant les plaques amyloïdes. (Yanker et al. Nature Med. Vol 2 No 8 (1996)). A ces signes s'ajoutent un nombre important d'autres changements anormaux incluant une altération des systèmes immunitaires et inflammatoires ainsi qu'une altération de la fonction mitochondriale pouvant conduire à une augmentation du stress oxydatif, une activation des mécanismes de l'apoptose et de manière ultime une mort cellulaire.

Les plaques amyloïdes sont majoritairement composées des peptides A-β à 40 ou 42 résidus qui sont générés lors du processus protéolytique de la protéine précurseur du peptide β-amyloïde (APP). Les dépôts extracellulaires de peptides A-β représentent la caractéristique précoce et invariable de toutes les formes de l'AD, incluant les formes familiales (FAD). Les FAD apparaissent de manière relativement précoce (entre 40 et 60 ans) et sont dues à des mutations dans le gène de l'APP dans 5 % des cas de FAD (> 20 familles) avec six mutations faux-sens simples ou doubles; dans le gène de la préséniline 1 (PS 1) dans 50 à 70 % des cas de FAD (> à 200 familles) avec plus de 80 mutations différentes identifiées jusqu'à présent; et dans le gène de la préséniline 2 (PS 2) dans moins de cas de FAD avec 2 mutations faux-sens décrites dans 8 familles. Des mutations dans ces trois gènes ont été démontrées comme induisant des changements dans la protéolyse de l'APP, qui conduisent à une surproduction de A-β et à l'apparition précoce de la pathologie et des symptômes qui sont similaires à ceux des formes sporadiques de l'AD.

La toxicité neuronale des plaques amyloïdes pourrait résider dans les fibrilles de poids moléculaire important qui sont formés par agrégation de peptides A-β solubles en formes fibrillaires d'abord solubles (dite aussi forme protofibrillaire) qui sont ensuite

converties en formes insolubles incorporées dans les plaques amyloïdes. En effet in vitro il a été montré que le peptide A-β soluble s'agrégeait progressivement en une forme fibrillaire (c-a-d qui peut être marqué par les agents tels que le rouge congo ou la thioflavine S qui reconnaissent les structures tertiaires en feuillet beta des peptides/protéines), de haut poids moléculaire (>200 kDa) mais encore soluble. Parce que cette forme est soluble, elle est souvent appelée forme protofibrillaire tandis que les fibrilles résultent d'une agrégation encore plus importante conduisant à la perte de solubilité. Les formes protofibrillaires de transition sont généralement considérées comme les précurseurs des fibres amyloïdes et pourraient être responsables du dysfonctionnement cellulaire et de la perte neuronale dans la maladie d'Alzheimer et dans d'autres maladies liées à l'agrégation de protéines.

Il a été montré que les plaques amyloïdes séniles (c'est-à-dire agrégées, on les appelle aussi plaques matures) sont corrélées avec le statut cognitif des patients Alzheimer contrairement aux dépôts diffus de peptide A-β qui sont aussi largement présents chez les patients non-atteints. (Duyckaerts et Al, Neurobiol.Aging 1997 ;18 : 33-42 et et Jellinger et Al. 1998 ; 54 :77-95). Cibler en particulier ces plaques amyloïdes séniles permet donc de traiter la pathologie Alzheimer de manière plus spécifique et efficace.

De nombreux traitements ont été tentés afin de prévenir la formation des peptides A-β, comme par exemple des inhibiteurs du processus protéolytique de l'APP.
Des stratégies d'immunothérapie comme l'administration d'anticorps anti-A-β (pour diminuer les dépôts amyloïdes) ou l'immunisation avec des antigènes des peptides A-β (pour promouvoir une réponse humorale) ont été testées afin de réduire la taille et la densité des plaques.
On a par exemple décrit (US 7 179 463) une méthode de traitement contre la maladie d'Alzheimer consistant à administrer un anticorps dirigé contre un protofibrille présentant une mutation Arctic à l'intérieur de la région codant pour le peptide A-β.
Aucun exemple d'anticorps n'est réellement décrit. De plus, aucune comparaison de l'affinité des anticorps pour les peptides en fonction du poids moléculaire de ces peptides n'a été réalisée. D'autres brevets (US 6 761 888 et US 6 750 324) ont évoqué des anticorps reconnaissant diverses épitopes le long de la séquence en acides aminés du peptide A-β_{42}. Une demande internationale (WO2007/108756) a été déposée concernant des anticorps spécifiques des protofibrilles mais les anticorps

décrits reconnaissent à la fois les peptides A-β de haut poids moléculaire et les oligomères de poids moyen. De plus l'affinité des anticorps pour les plaques matures par rapport à leur affinité pour les plaques diffuses n'est pas évoquée.

Malgré l'évolution actuelle des connaissances à propos de la maladie d'Alzheimer, il existe toujours un besoin pour des compositions et des méthodes de traitement et/ou de prévention de cette pathologie limitant au maximum les effets secondaires. Des anticorps tels que décrits dans la présente demande, humanisés et spécifiques de la forme protofibrillaire des peptides A-β ont pour but de résoudre ce problème. Permettant la reconnaissance des plaques amyloïdes séniles et non des plaques diffuses, les anticorps objet de l'invention reconnaissent les plaques pathologiques de façon beaucoup plus efficace que des anticorps reconnaissant toutes les formes d'Abeta, qui seront en grande partie fixés sur les dépôts diffus ou fixée sur les formes solubles de peptide A-β monomérique ou de bas poids moléculaire.

De plus, le fait de reconnaître uniquement les formes protofibrillaires des peptides A-β et non les formes protofibrillaires d'autres protéines non liées à la maladie d'Alzheimer évite des liaisons inutiles susceptibles de diminuer la concentration d'anticorps efficaces sur la maladie.

L'anticorps murin que l'on a humanisé portera le nom d'anticorps 13C3 dans toute la présente demande.
Les séquences pouvant coder pour ou constituer les anticorps humanisés objets de l'invention figurent dans le Tableau 2.

La présente invention concerne un anticorps humanisé se liant spécifiquement à la forme protofibrillaire du peptide A-β, soit un peptide de haut poids moléculaire.
Dans un mode plus avantageux, l'anticorps se lie au peptide A-β ayant un poids moléculaire supérieur à 200, 300, 400 ou 500 kDa.
Selon un mode de mise en œuvre, l'anticorps objet de l'invention se lie aux peptides A-β agrégés en plaques séniles et non aux dépôts diffus de peptides A-β.
Dans un mode de réalisation avantageux, l'anticorps objet de l'invention se lie spécifiquement aux formes protofibrillaires du peptide A-β mais pas aux autres protéines de structure amyloïdes (comme par exemple les IAPP Islet Amyloid Polypeptide).

La présente invention concerne également un anticorps humanisé ayant des fonctions effectrices diminuées, ce qui permet une limitation des effets adverses tels que l'apparition de micro-hémorragies et œdèmes vasogéniques

Dans un mode de réalisation avantageux, l'anticorps objet de l'invention ne possède plus de fonctions effectrices.

Dans un mode de réalisation encore plus avantageux, l'anticorps est une immunoglobuline G 4 dont le domaine Fc a subi des mutations diminuant la production de demi-molécules.

Dans un mode de réalisation encore plus avantageux, l'anticorps est une immunoglobuline G 4 dont le domaine Fc a subi des mutations diminuant l'activité effectrice.

La présente invention a pour objet un anticorps humanisé comprenant au moins un CDR codé par une séquence nucléotidique présentant une séquence identique à l'une des séquences SEQ ID NO : 9, 11, 13, 15, 17 et 19, ou par des séquences différant respectivement par 1, 2, 3, 4 ou 5 nucléotides de ces séquences.

La présente invention a également pour objet un anticorps humanisé comprenant au moins un CDR présentant une séquence identique à l'une des séquences SEQ ID NO : 10, 12, 14, 16, 18 et 20.

Dans un autre mode de réalisation, l'anticorps objet de l'invention comprend au moins un CDR dont la séquence diffère de un à deux acides aminés par rapport à l'une des séquences SEQ ID NO : 10, 12, 14, 16, 18, 20 et 32, pour autant que l'anticorps garde sa spécificité de liaison.

Dans un mode de réalisation avantageux, l'anticorps comprend les CDR codés par les séquences nucléotidiques SEQ ID NO : 9, 11, 13, 15, 17 et 19, ou par des séquences différant respectivement par 1,2,3,4 ou 5 nucléotides de ces séquences.

Dans un autre mode de réalisation avantageux, l'anticorps comprend les CDR de séquence SEQ ID NO : 10, 12, 14, 16, 18 et 20.

L'anticorps objet de l'invention peut aussi comprendre les CDR codés par les séquences nucléotidiques SEQ ID NO : 9, 11, 13, 31, 17 et 19 ou par des séquences différant respectivement par 1, 2, 3, 4 ou 5 nucléotides de ces séquences.

Dans un mode de réalisation avantageux, l'anticorps objet de l'invention comprend les CDR de séquence SEQ ID NO : 10, 12, 14, 32, 18 et 20.

Un objet de l'invention est l'anticorps humanisé comprenant les CDR codés par les séquences nucléotidiques SEQ ID NO : 9, 11, 29, 31, 17 et 19 ou par des séquences différant respectivement par 1, 2, 3, 4 ou 5 nucléotides de ces séquences.
Est également un objet de l'invention un anticorps humanisé comprenant les CDR de séquence SEQ ID NO : 10, 12, 30, 32, 18 et 20.

Dans un mode de réalisation avantageux, l'anticorps objet de l'invention comprend une partie variable de sa chaîne lourde (VH) codée par une séquence présentant au moins 80%, 85%, 90%, 95% ou 99% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 5 ou la séquence SEQ ID NO 27.
Dans un mode de réalisation avantageux, l'anticorps objet de l'invention comprend une partie variable de sa chaîne lourde (VH) comprenant une séquence présentant au moins 80%, 85%, 90%, 95% ou 99% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 6 ou la séquence SEQ ID NO 28.
Dans un mode de réalisation avantageux, l'anticorps objet de l'invention comprend une partie variable de sa chaîne légère (VL) codée par une séquence présentant au moins 80%, 85%, 90%, 95% ou 99% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 7 ou la séquence SEQ ID NO 23.
Dans un mode de réalisation avantageux, l'anticorps objet de l'invention comprend une partie variable de sa chaîne légère (VL) comprenant une séquence présentant au moins 80%, 85%, 90%, 95% ou 99% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 8 ou la séquence SEQ ID NO 24.

Dans un mode de réalisation encore plus avantageux, l'anticorps comprend une chaîne lourde comprenant une partie variable (VH) codée par l'une des séquences nucléotidiques SEQ ID NO 5 et SEQ ID NO 27.
Dans un mode de réalisation encore plus avantageux, l'anticorps comprend une chaîne lourde comprenant une partie variable (VH) de séquence polypeptidique SEQ ID NO 6 ou SEQ ID NO 28.

Dans un autre mode de réalisation, l'anticorps comprend une chaîne légère comprenant une partie variable (VL) codée par l'une des séquences nucléotidiques SEQ ID NO 7 et SEQ ID NO 23.

Dans un mode autre de réalisation, l'anticorps comprend une chaîne légère comprenant une partie variable (VL) de séquence polypeptidique SEQ ID NO 8 ou SEQ ID NO 24.

Dans un mode de réalisation avantageux, l'anticorps comprend les séquences codées par les séquences nucléotidiques SEQ ID NO : 5 et 7.

Dans un mode de réalisation avantageux, l'anticorps comprend les séquences polypeptidiques SEQ ID NO : 6 et 8.

Dans un autre mode de réalisation, l'anticorps comprend les séquences codées par les séquences nucléotidiques SEQ ID NO : 5 et 23.

Dans un autre mode de réalisation, l'anticorps comprend les séquences polypeptidiques SEQ ID NO : 6 et 24.

Dans un autre mode de réalisation, l'anticorps comprend les séquences codées par les séquences nucléotidiques SEQ ID NO : 27 et 23.

Dans un autre mode de réalisation, l'anticorps comprend les séquences polypeptidiques SEQ ID NO : 28 et 24.

La présente invention a également pour objet un anticorps comprenant une chaîne lourde codée par une séquence présentant au moins 80%, 85%, 90%, 95% ou 99% d'identité avec l'une des séquences nucléotidiques SEQ ID NO 1 et SEQ ID NO 25.

La présente invention a également pour objet un anticorps comprenant une chaîne lourde présentant au moins 80%, 85%, 90%, 95% ou 99% d'identité avec la séquence polypeptidique SEQ ID NO 2 ou avec la séquence polypeptidique SEQ ID NO 26.

Dans un mode de réalisation avantageux l'anticorps comprend une chaîne légère codée par une séquence présentant au moins 80%, 85%, 90%, 95% ou 99% d'identité avec l'une des séquences nucléotidiques SEQ ID NO 3 et SEQ ID NO 21.

Dans un autre mode de réalisation l'anticorps comprend une chaîne légère comprenant une séquence présentant au moins 80%, 85%, 90%, 95% ou 99% d'identité avec l'une des séquences polypeptidiques SEQ ID NO 4 et SEQ ID NO 22.

Un objet de l'invention est un anticorps comprenant les séquences codées par les séquences nucléotidiques SEQ ID NO : 1 et 3.
Un autre objet de l'invention est un anticorps dont la séquence comprend les séquences polypeptidiques SEQ ID NO : 2 et 4.

Un objet de l'invention est un anticorps comprenant les séquences codées par les séquences nucléotidiques SEQ ID NO : 1 et 21.
Un autre objet de l'invention est un anticorps dont la séquence comprend les séquences polypeptidiques SEQ ID NO : 2 et 22.

Un objet de l'invention est un anticorps comprenant les séquences codées par les séquences nucléotidiques SEQ ID NO : 25 et 21.
Un autre objet de l'invention est un anticorps dont la séquence comprend les séquences polypeptidiques SEQ ID NO : 26 et 22.

Un autre objet de l'invention est un anticorps humanisé anti-peptide Aβ ayant une affinité pour la forme protofibrillaire du peptide Aβ au moins 100 fois supérieure à son affinité pour les autres formes de ce peptide.

Un autre objet de l'invention est un anticorps caractérisé ce qu'il induit une diminution des plaques amyloïdes.

Un autre objet de l'invention est l'utilisation d'un anticorps humanisé anti-peptide Aβ dans le traitement des maladies associées aux troubles neuro-dégénératifs, et en particulier dans le traitement de la maladie d'Alzheimer.
Un autre objet de l'invention est une composition pharmaceutique comprenant un anticorps humanisé anti-peptide Aβ et des excipients.
Un autre objet de l'invention est une méthode de traitement de la maladie d'Alzheimer comprenant l'administration au patient d'un anticorps humanisé anti peptide- Aβ.

Un autre objet de l'invention est une cellule ou des cellules produisant un anticorps humanisé anti peptide-Aβ, ainsi que le procédé de production de cet anticorps comprenant la mise en culture de ces cellules. De telles cellules sont avantageusement issues d'une lignée cellulaire.

Un objet de l'invention est un médicament comprenant un anticorps humanisé anti peptide-Aβ.

Un objet de l'invention est un polynucléotide codant pour un polypeptide présentant au moins 80%, 85%, 90%, 95% ou 99% d'identité avec l'une des séquences SEQ ID NO : 2, 4, 6, 8, 22, 24, 26 ou 28.
Un autre objet de l'invention est un polynucléotide présentant une séquence ayant au moins 80%, 85%, 90%, 95% ou 99% d'identité avec l'une des séquences SEQ ID NO : 1, 3, 5, 7, 21, 23, 25, ou 27.

Un autre objet de l'invention est un vecteur recombinant comprenant un acide nucléique ayant l'une des séquences SEQ ID NO 1, 3, 5, 7, 21, 23, 25, ou 27, ainsi qu'une cellule hôte comprenant ce vecteur.

Définitions

Une liaison spécifique s'entend d'une différence d'un facteur d'au moins environ 10, 20, 30, 40, 50, ou 100 entre l'intensité de la liaison à un récepteur par rapport à un autre, ici entre la liaison à la forme protofibrillaire du peptide A-β et la liaison aux autres formes du peptide.

Par « épitope » on entend le site de l'antigène auquel se lie l'anticorps. Si l'antigène est un polymère, tel une protéine ou un polysaccharide, l'épitope peut être formé par des résidus contigus ou non-contigus. Ici l'épitope est conformationnel, c'est-à-dire lié à la structure tri-dimensionnelle du peptide A-β protofibrillaire.

Par « forme protofibrillaire » on entend une forme oligomérique de peptides A-β, soluble in vitro et pouvant être isolée comme une entité de poids moléculaire

supérieur à 200 kDa, 300 kDa, 400 kDa ou 500 kDa et qui peut fixer des agents tels que la thioflavine-S ou le rouge Congo.

Par « plaque sénile » on entend une plaque composée d'un noyau amyloïde (fixant la thioflavine S ou le rouge Congo) entouré de neurites dystrophiques et d'une réaction de cellules gliales. Les plaques séniles sont retrouvées en particulier chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, contrairement aux dépôts amyloïdes diffus (ne fixant pas la thioflavine S ou le rouge Congo) qui sont beaucoup plus nombreux mais ne sont pas associés à la maladie.

Un anticorps, aussi appelé immunoglobuline, est composé de deux chaînes lourdes identiques (« CH ») et de deux chaînes légères identiques (« CL ») qui sont liées par un pont disulfure. Chaque chaîne contient une région constante et une région variable. Chaque région variable comprend trois segments appelés « régions déterminant la complémentarité » (« CDRs ») ou « régions hypervariables », qui sont principalement responsables de la liaison à l'épitope d'un antigène.

Le terme « VH » fait référence aux régions variables d'une chaîne lourde d'immunoglobuline d'un anticorps, incluant les chaînes lourdes d'un fragment Fv, scFv, dsFv, Fab, Fab' ou F(ab)'.

Le terme « VL » fait référence aux régions variables d'une chaîne légère d'immunoglobuline d'un anticorps, incluant les chaînes légères d'un fragment Fv, scFv, dsFv, Fab, Fab' ou F(ab)'.

Par « anticorps » on entend également tout fragment fonctionnel d'anticorps: Fab (Fragment antigen binding), Fv, scFv (single chain Fv), Fc (Fragment cristallisable). De préférence, ces fragments fonctionnels seront des fragments de type Fv, scFv, Fab, F(ab') 2, Fab', scFv-Fc, des diabodies, des anticorps multispécifiques (notamment bi-spécifiques), des polypeptides synthétiques contenant les séquences d'un ou de CDRs, qui possèdent généralement la même spécificité de fixation que l'anticorps humanisé dont ils sont issus. Selon la présente invention, des fragments d'anticorps de l'invention peuvent être obtenus à partir des anticorps humanisés par

des méthodes telles que la digestion par des enzymes, comme la pepsine ou la papaïne et/ou par clivage des ponts disulfures par réduction chimique.
Les nanobodies rentrent également dans cette définition.

Par « régions CDR ou CDRs », on entend désigner les régions hypervariables des chaînes lourdes et légères des immunoglobulines comme définies par Kabat et al. (Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5t" Ed., U.S. Department of Health and Human Services, NIH, 1991, and later editions). Il existe 3 CDRs de chaîne lourde et 3 CDRs de chaîne légère. Le terme CDR ou CDRs est utilisé ici pour désigner suivant les cas, l'une de ces régions ou plusieurs, voire l'ensemble, de ces régions qui contiennent la majorité des résidus d'acides aminés responsables de la liaison affine de l'anticorps pour l'antigène ou l'épitope qu'il reconnaît. Les régions les plus conservées des domaines variables sont appelés régions ou séquences FR pour « framework » ou régions « charpentes ».

La présente invention concerne des anticorps humanisés.
Par « anticorps humanisé » on entend un anticorps qui contient principalement des séquences immunoglobuline humaines. Ce terme fait généralement référence à une immunoglobuline non humaine qui a été modifiées par incorporation de séquences humaines ou de résidus trouvés dans des séquences humaines.

En général, les anticorps humanisés comprennent un ou typiquement deux domaines variables dans lesquels tout ou partie des régions CDR correspondent à des parties issues de la séquence parente non humaine et dans lesquels tout ou partie des régions FR sont issus d'une séquence immunoglobuline humaine. L'anticorps humanisé peut alors comprendre au moins une portion d'une région constante d'immunoglobuline (Fc), en particulier celle de l'immunoglobuline humaine de référence choisie.
On cherche ainsi à obtenir un anticorps qui soit immunogène a minima chez un humain. Ainsi il est possible qu'un ou deux acides aminés d'un ou plusieurs CDRs soient modifiés par un acide aminé moins immunogène pour l'hôte humain, ceci sans réduire substantiellement la spécificité de liaison de l'anticorps au peptide A-β de haut poids moléculaire. De même, les résidus des régions charpentes peuvent ne pas être

humains et il est possible qu'ils ne soient pas modifiés car ils ne contribuent pas au potentiel immunogénique de l'anticorps.

Il existe plusieurs méthodes d'humanisation connues de l'homme du métier pour modifier un anticorps parent non-humain en un anticorps moins immunogène pour l'humain. Une identité globale des séquences avec un anticorps humain n'est pas forcément nécessaire. En effet l'identité globale de séquence n'est pas nécessairement un indicateur prédictif d'une immunogénicité réduite et la modification d'un nombre limité de résidus peut conduire à des anticorps humanisés présentant un potentiel immunogénique très atténué chez l'homme (Molecular Immunology (2007) 44, 1986-1998).

Diverses méthodes sont par exemple l'inclusion de CDRs (grafting) (EPO 0 239 400; WO 91/09967; et U.S. Pat. Nos. 5,530,101 et 5,585,089), le resurfaçage (EPO 0 592 106; EPO 0 519 596; Padlan, 1991, Molec Imm 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, Prot Eng 7(6):805-814; et Roguska et al., 1994, PNAS 91:969-973) ou encore le mélange des chaînes (U.S. Pat. No. 5,565,332).

La présente invention concerne en particulier des anticorps humanisés dont les parties variables sont modifiées selon la technologie explicitée dans la demande de brevet internationale WO 2009/032661.
Cette technique utilise notamment une simulation de dynamique moléculaire à partir de modèles tridimensionnels d'anticorps, lesdits modèles étant construits par homologie.

La présente invention concerne aussi toute forme d'anticorps ayant des fonctions effectrices diminuées, comme des immunoglobulines portant des mutations du domaine Fc réduisant son affinité pour les récepteurs du système immunitaire ou comme des nanobodies.

Par « fonctions effectrices » on entend toute fixation du domaine Fc de l'anticorps à des récepteurs ou protéines induisant des réponses immunitaires. La diminution de ces fonctions effectrices permet de diminuer des effets adverses tels que le déclenchement de micro-hémorragies (Racke et al. J Neurosci 2005, 25:629).

L'affinité peut être mesurée par toute technique connue de l'homme du métier. Elle est avantageusement mesurée selon la technique Biostat Speed développée à partir des algorithmes décrits par Ratkovsk DA et Reedy TJ (Biometrics, 1986, 42, 575-82).

Afin de permettre l'expression de chaînes lourdes et/ou chaînes légères de l'anticorps, objet de l'invention, les polynucléotides codant pour lesdites chaînes sont insérés dans des vecteurs d'expression. Ces vecteurs d'expression peuvent être des plasmides, des YACs, des cosmides, des rétrovirus, des épisomes dérivés d'EBV, et tous les vecteurs que l'homme du métier peut juger appropriés à l'expression desdites chaînes.

Ces vecteurs peuvent être utilisés pour transformer des cellules avantageusement issues d'une lignée cellulaire. Une telle lignée cellulaire est encore plus avantageusement issue d'un mammifère.
Elle est avantageusement la lignée CHO ou une lignée dérivée de cette lignée, ou encore la lignée HEK293 ou une lignée dérivée de cette lignée.

La transformation des cellules peut être effectuée par toute méthode connue de l'homme du métier pour introduire des polynucléotides dans une cellule hôte. Une telle méthode peut être la transformation à l'aide de dextrane, la précipitation par du phosphate de calcium, la transfection à l'aide de polybrène, la fusion de protoplastes, l'électroporation, l'encapsulation des polynucléotides dans liposomes, l'injection biolistique et la micro-injection directe d'DNA dans le noyau.

Les anticorps objet de l'invention peuvent être compris dans des compositions pharmaceutiques en vue d'une administration par voie topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, etc. Préférentiellement, les compositions pharmaceutiques contiennent des véhicules pharmaceutiquement acceptables pour une formulation injectable. Il peut s'agir en particulier de solutions salines (phosphate monosodique, disodique, chlorure de sodium, potassium, calcium ou magnésium, etc., ou des mélanges de tels sels), stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables.

A titre d'exemple une composition pharmaceutique comprend (1) un tampon phosphate Dulbecco (pH ~ 7.4), contenant éventuellement 1 mg/ml à 25 mg/ml de sérum albumine humaine, (2) 0.9% w/v de chlorure de sodium (NaCl)), et (3) 5% (w/v) de dextrose. Elle peut aussi comprendre un antioxydant tel que du tryptamine et un agent stabilisant tel que du Tween 20.

Les pathologies visées peuvent être toutes les maladies liées au dépôt de plaques amyloïdes. En particulier, la pathologie visée est la maladie d'Alzheimer.

Les doses dépendent de l'effet souhaité, de la durée du traitement et de la voie d'administration utilisée ; elles sont généralement comprises entre 5 mg et 1000 mg d'anticorps par jour pour un adulte. De manière générale le médecin déterminera le dosage approprié en fonction du stade de la maladie, de l'âge du patient, de son poids ou de tout autre facteur à prendre en compte en fonction du patient.

La présente invention est illustrée, sans pour autant être limitée, par les exemples qui suivent.

Brève description des figures :

Fig 1 A: Carte du plasmide pXL4973 permettant l'expression de la chaîne légère LC1 de l'anticorps antiAbeta 13C3-VH1VL1.

Fig 1 B: Carte du plasmide pXL4979 permettant l'expression de la chaîne lourde HC1 de l'anticorps antiAbeta 13C3-VH1VL1.

Fig 2A et 2B : Séparation des protofibrillles et des oligomères de faible masse moléculaire par gel filtration sur Superdex 75 (respectivement à t=0 et à t=16h).

Fig 3 : Détermination de la masse moléculaire des protofibrilles.

Fig 4 A, 4B et 4C : Détermination des affinités des anticorps humanisés (respectivement anticorps LP09027 (4A), LP09026 (4B) et LP09028 (4C)) pour les protofibrilles (moyenne de 3 expériences ± sem).

Fig 5 : Spécificité de l'anticorps humanisé LP09027 vis à vis des fibrilles de Aβ.

Fig 6A et 6B : Spécificité de l'anticorps humanisé (LP09027) pour les plaques matures séniles respectivement du cortex frontal (6A) et de l'hippocampe (6B) d'une souris. Les flèches indiquent les plaques séniles.

EXEMPLES :

Exemple 1 : Obtention des anticorps humanisés

Un anticorps murin 13C3 a été humanisé.

Cet exemple décrit la séquence et l'obtention de l'anticorps humanisé anti-peptide Aβ VH1VL1 (LP09027) par production en expression transitoire dans la lignée mammifère HEK293 nommée FreeStyle 293-F.

Les cDNA codant pour les chaines variables humanisées VL1 et VH1 sont fusionnés aux cDNA codant pour les régions constantes humaines Ckappa et IgG4 respectivement. La séquence de la région constante IgG4 est celle du variant ayant les substitutions S241P and L248E dans la nomenclature de Kabat, afin de diminuer significativement la production de demi-molécules (Angla *et al.*, 1993, *Mol. Immunol.*, 30: 105-108) et les fonctions effectrices (WO 97/09351).

Les séquences nucléiques codant pour CH1 (SEQ ID NO 1) et pour CL1 (SEQ ID NO 3) ont été clonées indépendamment dans le vecteur d'expression pour générer respectivement les plasmides pXL4973 (Fig 1A) et pXL4979 (Fig 1B).

Un lot de l'anticorps est produit par production en expression transitoire dans la lignée FreeStyle 293-F (Invitrogen) après co-transfection des plasmides pXL4973 et pXL4979 selon le protocole décrit par Invitrogen (référence catalogue K9000-01). Ce lot (LP09027) est ensuite purifié par chromatographie d'affinité sur une colonne de gel MabSelect (Amersham) selon les recommandations du fournisseur puis formulé dans le tampon PBS (référence Dulbecco 14190-094) et filtré stérilement (0.2 µm). A partir de 1 L de culture, 33 mg d'anticorps sont obtenus avec une pureté de 97 % par SDS-PAGE dans des conditions dénaturantes et par chromatographie d'exclusion stérique. La masse obtenue par SDS-PAGE dans des conditions dénaturantes et par LC/MS est en accord avec la séquence primaire en acide aminés et la présence d'un N-glycan sur le domaine Fc soit une masse de 23969 Da pour la LC1 et 49650 Da pour la HC1 prenant en compte le N-glycan sous la forme G0F. La masse obtenue par SDS-PAGE dans des conditions non dénaturantes et par chromatographie d'exclusion de taille est en accord avec la structure hétéro-tétramérique de l'anticorps de 150 kDa.(Fig 4A).

Selon le même procédé, les lots d'anticorps humanisés LP09026 et LP09028 ont été produits à partir des séquences nucléotidiques SEQ ID NO 25 et SEQ ID NO 21 pour LP09026 (Fig 4B), et SEQ ID NO 1 et SEQ ID NO 21 pour LP09028 (Fig 4C).

Exemple 2 : Préparation des protofibrilles à partir du peptide Aβ (1-42).

Les protofibrilles ont été préparées à partir du peptide synthétique Aβ (1-42) selon la méthode décrite par Johansson et al. (FEBS, 2006, 2618-2630). Le peptide lyophilisé (Anaspec référence 24224) est mis en solution dans 10mM NaOH à la concentration de 100µM, puis agité pendant 1 mn et incubé sur la glace pendant 10mn. La solution de peptide est ensuite diluée dans le tampon 100mM phosphate de sodium, 200mM NaCl pH=7.4 à une concentration de 50 µM, puis agité 1mn. La préparation est incubée une nuit à 37°C pour obtenir la formation de protofibrilles puis centrifugée à 17900g pendant 15 mn à 16°C pour éliminer les agrégats insolubles. Pour séparer les protofibrilles des formes oligomériques de Aβ de faible masse moléculaire, le surnageant est chargée sur une colonne de gel filtration Superdex 75 équilibrée dans le tampon 50 mM acétate d'ammonium pH=8.5. Les fractions correspondant aux protofibrilles et aux oligomères de faible masse moléculaire sont collectées et stockées à 4°C. La figure 2 montre un profil type de séparation des protofibrilles. La masse moléculaire des protofibrilles est déterminée par gel filtration Superdex200 en utilisant comme marqueurs de masse de moléculaire le kit de calibration Biorad (référence 150-1901). La figure 3 montre que la masse moléculaire des protofibrilles est supérieure à 200KDa.

Exemple 3 : Spécificité et affinité des anticorps humanisés vis-à-vis des protofibrilles

50µl de protofibrilles et oligomères de faible masse moléculaire à la concentration de 1 µg/ml dans du PBS (Gibco, référence 70011) sont déposés dans les puits d'une plaque ELISA (Nunc, référence 442404) et incubés à 4°C pendant une nuit. Après élimination de l'excès d'antigène, 200 µl de tampon PBS + 5% lait en poudre (poids /volume) sont déposés dans chaque puits pour éliminer les adsorptions non

spécifiques et incubés pendant 2h à température ambiante. Les puits sont ensuite lavés 4 fois avec 300 µl de tampon PBS tween 0.02%. 50µl d'une solution d'anticorps primaire (dilution de 3 en 3 dans du PBS Tween à partir d'une concentration de 100µg/ml pour les oligomères et à partir de 25 µg/ml pour les protofibrilles) sont ajoutés à chaque puits et incubés 1h à température ambiante. Les puits sont lavés 4 fois avec 300µl de tampon PBS Tween. L'anticorps secondaire anti-Fc humain couplé à la peroxydase (Goat Anti Human IgG (Fc) peroxidase conjugated, Pierce, référence 31413) dilué au 1/10000 dans du tampon PBS Tween est ajouté à chaque puits et incubé 1h à température ambiante. Après 4 lavages avec 300µl de PBS Tween, 100µl de TMB (Interchim, référence UP664782) sont ajoutés à chaque puits et incubés pendant environ 10mn, puis la réaction est arrêtée avec une solution de HCl 1M (Interchim, référence UPS29590) et les plaques sont lues à une DO mesurée à la longueur d'onde de 450nm. Les EC50 sont déterminées par BioStat Speed. Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau 1 ainsi que dans la figure 4 et montrent la très grande spécificité de l'anticorps pour les protofibrilles par rapport aux oligomères de faible masse moléculaires (facteur 184).

Tableau 1 :

EC50 (µg/ml)	LMW	PF	LMW/PF
LP09026	41.4 ± 40.1	0.0587 ± 0.004	705.3
LP09027	14.7 ± 2.7	0.0798 ± 0.007	184.2
LP09028	21.8 ± 5.3	0.0892 ± 0.007	244.4

Le peptide Aβ1-42 lyophilisé (Anaspec référence 24224) est dissous selon les recommandations du fournisseur : 40 µl de NH4OH 1% sont ajoutés à 500 µg d'Aβ1-42. Après complète dissolution, 460 µl de PBS sont ajoutés pour obtenir une concentration de 1 mg/ml. Des aliquots de 10 µl sont préparés et stockés à -80°C.

50µl d'une solution de peptide Aβ1-42 à la concentration de 1µg/ml dans le tampon carbonate ($NaHCO_3$ 0.025 M (Acros Organics, référence 217120010), Na_2CO_3 0.025 M (Acros Organics, référence 207810010), pH 9.7 est déposée dans les puits d'une plaque ELISA et incubée pendant la nuit à température ambiante. Comme

précédemment les puits sont lavés avec le tampon PBS Tween, incubés en présence de tampon PBS + 5% lait en poudre (poids /volume) et lavés avec le tampon PBS tween. L'anticorps humanisé à la concentration de 0,02 µg/ml est incubé pendant 1h à température ambiante avec une gamme de concentration (à partir de 1 µg/ml) de peptides Aβ1-28 (Bachem, référence H7865), Aβ1-16 ((Anaspec, référence 24225), Aβ25-35 ((Anaspec, référence 24227), des oligomères de faible masse moléculaire ou des protofibrilles préparés comme décrits précédemment. Le mélange anticorps /antigène est ensuite déposé dans chaque puits et la plaque de microtitration incubée pendant 1h à température ambiante. L'anticorps libre non complexé est déterminé selon le même protocole ELISA que décrit précédemment. Ces expériences de compétition montrent que seules les protofibrilles avec une affinité beaucoup plus grande que les oligomères de faible masse moléculaire sont capables de neutraliser l'anticorps humanisé en l'empêchant d'interagir avec le pepdie Aβ1-42, aucun des peptides n'est capable de neutraliser l'anticorps.

Exemple 4 : Spécificité de l'anticorps humanisé LP09027 vis à vis des fibrilles de Aβ1-42

Le peptide Aβ1-42 (Anaspec, 20276) est dissous dans 200 µl de NaOH 10 mM à une concentration de 5 mg/ml. Le peptide IAPP (Anaspec, 60804) est dilué dans 200 µl de DMSO 50% à une concentration de 5 mg/ml. 100 µl de chaque préparation sont dilués dans 400 µl de PBS 1.25X. La concentration finale des peptides est de 1 mg/ml dans 500 µl. Les échantillons sont incubés 72h à 37°C. Après l'incubation, les échantillons sont centrifugés à 17900g pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot est lavé 3 fois avec du PBS 1X. Après le dernier lavage, le culot de fibrilles est repris dans 150 µl de PBS. Pour contrôler la présence de fibrilles de type amyloïde, un test de fluorescence de la thioflavine T (Anaspec, 88306) est réalisé. 20 µl de thioflavine T (20 µM final), 10 µl de l'échantillon et 70 µl de PBS 1X (volume final 100 µl) sont mélangés dans un puit d'une plaque noire (Corning, 3792). La thioflavine T est excitée à 450 nm et, en présence de structure de type amyloïde, émet une fluorescence à 482 nm. 50µl de fibrilles d'Aβ1-42 à 1 µg/ml et IAPP à 0.5 µg/ml sont déposés dans chaque puits d'une plaque de microtitration. Le protocole ELISA est appliqué en utilisant des dilutions en série de l'anticorps humanisé à partir de 10

µg/ml. La figure 5 montre que l'anticorps humanisé LP09027 reconnait spécifiquement les fibrilles de Aβ1-42 mais pas celles d'IAPP.

Exemple 5 : Spécificité de l'anticorps humanisé LP09027 pour les plaques séniles matures et non pour les plaques diffuses

L'anticorps humanisé (LP09027) conjugué avec la digoxygenine (digoxigenin-3-O-methylcarbonyl-ε-aminocaproic acid-N-hydroxysuccinimide ester: Roche 11333054001 ; 11418165001) a été utilisé en Immunohistochimie (Robot Ventana) sur des coupes de cerveaux de souris APP PS1 (modèle Alzheimer décrit par Schmitz C. et al., Am. J. Pathol, 2004, 164, 1495-1502)) ainsi que des coupes de cerveaux humains (cortex cérébral) provenant de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Les échantillons ont été préalablement fixés dans le formol et inclus en paraffine.

Les résultats obtenus chez la souris (figures 6A et 6B) montrent clairement que l'anticorps humanisé reconnaît exclusivement les plaques séniles matures et denses, mais pas les dépôts diffus du peptide Aβ.

Ces données sont en corrélation avec les propriétés de cet anticorps qui est spécifique de la forme Abeta protofibrillaire et ne reconnaît donc pas les formes soluble, mono-ou oligomériques de ce peptide.

Tableau 2 :

	Séquences nucléotidiques	**Séquences protéiques**
Anticorps 1 VH1VL1		
VH_1 + CH_1	SEQ ID NO 1	SEQ ID NO 2
VL_1+ CL_1	SEQ ID NO 3	SEQ ID NO 4
VH_1	SEQ ID NO 5	SEQ ID NO 6
VL_1	SEQ ID NO 7	SEQ ID NO 8
CDR VH_1	SEQ ID NO 9, 11, 13	SEQ ID NO 10, 12, 14
CDR VL_1	SEQ ID NO 15, 17, 19	SEQ ID NO 16, 18, 20
Anticorps 2 VH1 VL2		
VH_1 + CH_1	SEQ ID NO 1	SEQ ID NO 2
VL_2 + CL_2	SEQ ID NO 21	SEQ ID NO 22
VH_1	SEQ ID NO 5	SEQ ID NO 6
VL_2	SEQ ID NO 23	SEQ ID NO 24
CDR VH_1	SEQ ID NO 9, 11, 13	SEQ ID NO 10, 12, 14
CDR VL_2	SEQ ID NO 31, 17, 19	SEQ ID NO 32, 18, 20
Anticorps 3 VH2 VL2		
VH_2 + CH_2	SEQ ID NO 25	SEQ ID NO 26
VL_2 + CL_2	SEQ ID NO 21	SEQ ID NO 22
VH_2	SEQ ID NO 27	SEQ ID NO 28
VL_2	SEQ ID NO 23	SEQ ID NO 24
CDR VH_2	SEQ ID NO 9, 11, 29	SEQ ID NO 10, 12, 30
CDR VL_2	SEQ ID NO 31, 17, 19	SEQ ID NO 32, 18, 20

Revendications

1. Anticorps humanisé spécifique de la forme protofibrillaire du peptide A-β.

2. Anticorps selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il se lie aux peptides A-β agrégés en plaques séniles et non aux dépôts diffus de peptides A-β.

3. Anticorps selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un CDR codé par une séquence nucléotidique présentant une séquence identique à l'une des séquences SEQ ID NO : 9, 11, 13, 15, 17 et 19, ou par des séquences différant respectivement par 1, 2, 3, 4 ou 5 nucléotides de ces séquences.

4. Anticorps selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un CDR présentant une séquence identique à l'une des séquences SEQ ID NO : 10, 12, 14, 16, 18 et 20.

5. Anticorps selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un CDR dont la séquence diffère de un à deux acides aminés par rapport à l'une des séquences SEQ ID NO : 10, 12, 14, 16, 18 et 20, pour autant que l'anticorps garde sa spécificité de liaison.

6. Anticorps selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend les CDR codés par les séquences nucléotidiques SEQ ID NO 9, 11, 13, 15, 17 et 19, ou par des séquences différant respectivement par 1, 2, 3, 4 ou 5 nucléotides de ces séquences.

7. Anticorps selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend les CDR de séquence SEQ ID NO : 10, 12, 14, 16, 18 et 20.

8. Anticorps selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend les CDR codés par les séquences nucléotidiques SEQ ID NO 9, 11, 13, 31, 17 et 19, ou par des séquences différant respectivement par 1, 2, 3, 4 ou 5 nucléotides de ces séquences.

9. Anticorps selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend les CDR de séquence SEQ ID NO : 10, 12, 14, 32, 18 et 20.

10. Anticorps selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend les CDR codés par les séquences nucléotidiques SEQ ID NO 9, 11, 29, 31, 17 et 19, ou par des séquences différant respectivement par 1, 2, 3, 4 ou 5 nucléotides de ces séquences.

11. Anticorps selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend les CDR de séquence SEQ ID NO : 10, 12, 30, 32, 18 et 20.

12. Anticorps selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la partie variable de sa chaîne lourde est codée par une séquence présentant au moins 80% d'identité avec l'une des séquences SEQ ID NO : 5 et SEQ ID NO 27.

13. Anticorps selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la partie variable de sa chaîne lourde comprend une séquence présentant au moins 80% d'identité avec l'une des séquences SEQ ID NO : 6 et SEQ ID NO 28.

14. Anticorps selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la partie variable de sa chaîne légère est codée par une séquence présentant au moins 80% d'identité avec l'une des séquences SEQ ID NO : 7 et SEQ ID NO 23.

15. Anticorps selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que la partie variable de sa chaîne légère comprend une séquence présentant au moins 80% d'identité avec l'une des séquences SEQ ID NO : 8 et SEQ ID NO 24.

16. Anticorps selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend une chaîne lourde comprenant une partie variable codée par l'une des séquences nucléotidiques SEQ ID NO 5 et SEQ ID NO 27.

17. Anticorps selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend une chaîne lourde comprenant une partie variable de séquence polypeptidique SEQ ID NO 6 ou SEQ ID NO 28.

18. Anticorps selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend une chaîne légère comprenant une partie variable codée par l'une des séquences nucléotidiques SEQ ID NO 7 et SEQ ID NO 23.

19. Anticorps selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend une chaîne légère comprenant une partie variable de séquence polypeptidique SEQ ID NO 8 ou SEQ ID NO 24.

20. Anticorps selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend des séquences codées par les séquences nucléotidiques SEQ ID NO : 5 et 7.

21. Anticorps selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que sa séquence comprend les séquences polypeptidiques SEQ ID NO : 6 et 8.

22. Anticorps selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend une chaîne lourde codée par une séquence présentant au moins 80% d'identité avec l'une des séquences nucléotidiques SEQ ID NO 1 et SEQ ID NO 25.

23. Anticorps selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend une chaîne lourde présentant au moins 80% d'identité avec l'une des séquences polypeptidiques SEQ ID NO 2 et SEQ ID NO 26.

24. Anticorps selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend une chaîne légère codée par une séquence présentant au moins 80% d'identité avec l'une des séquences nucléotidiques SEQ ID NO 3 et SEQ ID NO 21.

25. Anticorps selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend une chaîne légère une séquence présentant au moins 80% d'identité avec l'une des séquences polypeptidiques SEQ ID NO 4 et SEQ ID NO 22.

26. Anticorps selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend les séquences codées par les séquences nucléotidiques SEQ ID NO : 1 et 3.

27. Anticorps selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que sa séquence comprend les séquences polypeptidiques SEQ ID NO : 2 et 4.

28. Anticorps selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend des séquences codées par les séquences nucléotidiques SEQ ID NO : 5 et 23.

29. Anticorps selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que sa séquence comprend les séquences polypeptidiques SEQ ID NO : 6 et 24.

30. Anticorps selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend des séquences codées par les séquences nucléotidiques SEQ ID NO : 27 et 23.

31. Anticorps selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que sa séquence comprend les séquences polypeptidiques SEQ ID NO : 28 et 24.

32. Anticorps selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il induit une diminution des plaques amyloïdes.

33. Anticorps selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que son affinité pour la forme protofibrillaire du peptide Aβ est au moins 100 fois supérieure à son affinité pour les autres formes de ce peptide.

34. Utilisation d'un anticorps selon l'une quelconque des revendications précédentes dans le traitement des maladies associées aux troubles neuro-dégénératifs

35. Utilisation d'un anticorps selon l'une quelconque des revendications précédentes dans le traitement de la maladie d'Alzheimer

36. Composition pharmaceutique comprenant un anticorps selon l'une quelconque des revendications 1 à 34 et des excipients.

37. Méthode de traitement de la maladie d'Alzheimer caractérisée en ce qu'elle comprend l'administration au patient d'un anticorps selon l'une quelconque des revendications 1 à 34.

38. Cellule produisant des anticorps selon la revendication 1 à 34.

39. Procédé de production d'un anticorps selon l'une quelconque des revendications 1 à 34 caractérisé en ce qu'il comprend la mise en culture de cellules selon la revendication 38.

40. Médicament comprenant un anticorps selon l'une quelconque des revendications 1 à 34.

41. Polynucléotide codant pour un polypeptide présentant au moins 80% d'identité avec l'une des séquences SEQ ID NOS : 2, 4, 6, 8, 22, 24, 26 ou 28.

42. Polynucléotide caractérisé en ce qu'il présente une séquence présentant au moins 80% d'identité avec l'une des séquences SEQ ID NOS : 1, 3, 5, 7, 21, 23, 25, ou 27.

43. Vecteur recombinant comprenant un acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 41 et 42.

44. Cellule hôte comprenant un vecteur selon la revendication 43.