



(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 1992/02/07
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 1992/08/20
(45) Date de délivrance/Issue Date: 2007/11/06
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 1992/10/05
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 1992/000111
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 1992/013949
(30) Priorités/Priorities: 1991/02/08 (FR91/01487);
1991/04/12 (FR91/04527)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *C12N 15/12* (2006.01),
A61K 31/711 (2006.01), *A61K 38/17* (2006.01),
A61K 39/395 (2006.01), *C07H 21/04* (2006.01),
C07K 14/725 (2006.01), *C07K 16/28* (2006.01),
C12P 19/34 (2006.01), *C12Q 1/68* (2006.01),
G01N 33/566 (2006.01)

(72) Inventeurs/Inventors:
HERCEND, THIERRY, FR;
TRIEBEL, FREDERIC, FR;
ROMAN-ROMAN, SERGIO, FR;
FERRADINI, LAURENT, FR

(73) Propriétaire/Owner:
ROUSSEL-UCLAF, FR

(74) Agent: ROBIC

(54) Titre : SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES CODANT POUR DES REGIONS VARIABLES DE CHAINES ALPHA DES
RECEPTEURS DES LYMPHOCYTES HUMAINS AINSI QUE LEURS APPLICATIONS
(54) Title: NUCLEOTIDIC SEQUENCES CODING FOR ALPHA CHAIN VARIABLE REGIONS IN HUMAN LYMPHOCITE
RECEPTORS AND APPLICATIONS THEREOF

(57) **Abrégé/Abstract:**

La présente invention concerne de nouvelles séquences nucléotidiques codant pour des régions variables de chaînes α des récepteurs des lymphocytes T humains, les segments peptidiques correspondants et les applications diagnostiques et thérapeutiques.





LE MANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C12N 15/12, 15/63, C12P 21/08 A61K 37/02, 39/395, G01N 33/577 C12Q 1/68, C07K 15/00	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 92/13949 (43) Date de publication internationale: 20 août 1992 (20.08.92)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR92/00111 (22) Date de dépôt international: 7 février 1992 (07.02.92) (30) Données relatives à la priorité: 91/01487 8 février 1991 (08.02.91) FR 91/04527 12 avril 1991 (12.04.91) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): ROUSSEL-UCLAF [FR/FR]; 35, boulevard des Invalides, F-75007 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : HERCEND, Thierry [FR/FR]; 15, rue Charles VII, F-94130 Nogent-sur-Marne (FR). TRIEBEL, Frédéric [FR/FR]; 36, rue Peronnet, F-92200 Neuilly-sur-Seine (FR). ROMAN-ROMAN, Sergio [FR/FR]; 42, rue Dareau, F-75014 Paris (FR). FERRADINI, Laurent [FR/FR]; 6, rue Léopold-Robert, F-75014 Paris (FR).		(74) Mandataire: BOURGOUIN, André; Roussel-UCLAF, 111, route de Noisy - B.P. 9, F-93230 Romainville (FR). (81) Etats désignés: AT (brevet européen), AU, BE (brevet européen), CA, CH (brevet européen), DE (brevet européen), DK (brevet européen), ES (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), GR (brevet européen), IT (brevet européen), JP, KR, LU (brevet européen), MC (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US. Publiée Avec rapport de recherche internationale.
(54) Title: NUCLEOTIDE SEQUENCES CODING FOR ALPHA CHAIN VARIABLE REGIONS IN HUMAN LYMPHOCYTE RECEPTORS AND APPLICATIONS THEREOF (54) Titre: SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES CODANT POUR DES REGIONS VARIABLES DE CHAINES ALPHA DES RECEPTEURS DES LYMPHOCYTES HUMAINS AINSI QUE LEURS APPLICATIONS (57) Abstract Novel nucleotide sequences coding for alpha chain variable regions in human T lymphocyte receptors, corresponding peptide segments and diagnostic and therapeutic applications thereof. (57) Abrégé La présente invention concerne de nouvelles séquences nucléotidiques codant pour des régions variables de chaînes α des récepteurs des lymphocytes T humains, les segments peptidiques correspondants et les applications diagnostiques et thérapeutiques.		

SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES CODANT POUR DES REGIONS VARIABLES DE CHAINES
ALPHA DES RECEPTEURS DES LYMPHOCYTES HUMAINS AINSI QUE LEURS APPLICATIONS

5

La présente invention concerne de nouvelles séquences nucléotidiques codant pour des régions variables des chaînes α des récepteurs des cellules T, les segments peptidiques
10 correspondants et les applications diagnostiques et thérapeutiques.

Il est connu que les récepteurs reconnaissant les antigènes à la surface des lymphocytes T matures (désignés ci-après récepteurs des cellules T) possèdent une structure
15 ayant une certaine analogie avec celles des immunoglobulines. Ainsi, ils comprennent des structures hétérodimériques comportant des chaînes glycoprotéiques α et β ou des chaînes glycoprotéiques γ et δ (voir Meuer et al. (1), Moingeon et al. (2), Brenner et al. (3), Bank et al. (4)).

20 Le répertoire des récepteurs des cellules T doit pouvoir faire face à l'immense diversité des déterminants antigéniques. Ceci est obtenu par recombinaison génétique des différents segments discontinus des gènes qui codent pour les différentes régions structurales des récepteurs des cellules
25 T. Ainsi, les gènes comprennent des segments V (segments variables), éventuellement des segments D (segments de diversité), des segments J (segments de jonction) et des segments C (segments constants). Pendant la différenciation des cellules T, des gènes spécifiques sont créés par recombinaison des
30 segments V, D et J pour les locus β et δ et des segments V et J pour les locus α et γ . Ces combinaisons spécifiques ainsi que l'appariement des deux chaînes créent la diversité combinatoire. Cette diversité est fortement amplifiée par deux mécanismes supplémentaires, à savoir la réunion imprécise des
35 segments V-D-J ou V-J et l'addition de nucléotides correspondant à la région N (Davis et al. (5)).

On connaît déjà un certain nombre de segments géniques V. Ces segments ont été groupés en sous-familles en fonction de

la similarité des séquences. Par définition, les segments qui présentent plus de 75 % de similarité dans la séquence nucléotidique ont été considérés comme des membres de la même sous famille (Crews et al. 6)). Les segments géniques V α connus ont 5 ainsi été classés en 22 sous familles dont 14 avec un seul membre (voir Concannon et al. (7), Kimura et al. (8), Wilson et al. (9)).

Par ailleurs, environ 60 segments géniques J α ont été décrits (9).

10 On a par ailleurs décrit récemment dans WO 90/06758 des anticorps monoclonaux dirigés contre des segments spécifiques des parties variables des récepteurs des cellules T, notamment des chaînes β et δ . Ces anticorps monoclonaux sont utiles non seulement comme outils de diagnostic mais également comme 15 outils thérapeutiques, par exemple vis-à-vis de l'arthrite rhumatoïde.

On a également décrit l'utilisation de peptides synthétiques correspondant à des régions variables des chaînes α ou β dans le traitement des maladies auto-immunes (23 et 24).

20 Il est connu par ailleurs qu'il existe des variations d'un individu à un autre dans l'expression des différents segments variables du récepteur T chez l'homme (27 et 28).

La présente invention vise à enrichir le répertoire des segments géniques codant pour des régions variables de chaînes 25 α des récepteurs des cellules T en fournissant d'une part de nouveaux segments géniques V α appartenant à des nouvelles sous familles ou appartenant à des sous-familles dont on connaît déjà au moins un membre et d'autre part, de nouveaux segments géniques J α .

30 La présente invention a ainsi pour objet des séquences nucléotidiques codant pour des régions variables de chaînes α des récepteurs des lymphocytes T humains, correspondant à des ADNc comprenant des séquences nucléotidiques choisies parmi l'un quelconque :

35 a - des segments V α correspondant à l'une des séquences SEQ ID N° 1 à 11, et

b - des segments J α correspondant à l'une des séquences SEQ ID N° 12, 13 et 15 à 20,

et les séquences qui en diffèrent par un ou plusieurs nucléotides.

Plus particulièrement, la présente invention a pour objet une séquence nucléotidique codant pour une région variable de chaînes α des récepteurs des lymphocytes T humains, correspondant à un ADNc comprenant une séquence nucléotidique choisie parmi l'un quelconque:

a - des segments V α correspondant à l'une des séquences SEQ ID N° 1 à 11, et

10 b - des segments J α correspondant à l'une des séquences SEQ ID N° 12, 13 et 15 à 20,

ou une séquence qui en diffère par jusqu'à 8 nucléotides.

La présente invention a plus particulièrement pour objet :

- des séquences codant pour des régions variables des chaînes α des récepteurs des lymphocytes T humains, correspondant à des ADNc comprenant des séquences nucléotidiques choisies parmi l'un quelconque des segments V α correspondant à l'une des séquences SEQ ID N° 1 à 10, et les séquences qui en diffèrent par un ou plusieurs nucléotides.

20 - des séquences codant pour des régions variables des chaînes α des récepteurs des lymphocytes T humains, correspondant à des ADNc comprenant des séquences nucléotidiques choisies parmi l'un quelconque des segments J α correspondant à l'une des séquences SEQ ID N° 12, 13 et 15 à 20, et les séquences qui en diffèrent par un ou plusieurs nucléotides.

Par l'expression "et les séquences qui en diffèrent par un ou plusieurs nucléotides", on englobe les allèles qui présentent jusqu'à 8 nucléotides de différence, mais le plus souvent 1 ou 2 nucléotides de différence ou qui peuvent différer par la délétion ou l'addition d'un ou deux codons.

30 La présente invention a également plus particulièrement pour objet :

3a

- des séquences nucléotidiques codant pour des régions variables des chaînes α des récepteurs des lymphocytes T humains correspondant à des ADNC correspondant à tout ou partie des séquences nucléotidiques choisies parmi l'un quelconque des segments Va correspondant à l'une des séquences SEQ ID N° 2 à 5, et les séquences qui en diffèrent par un ou deux nucléotides,

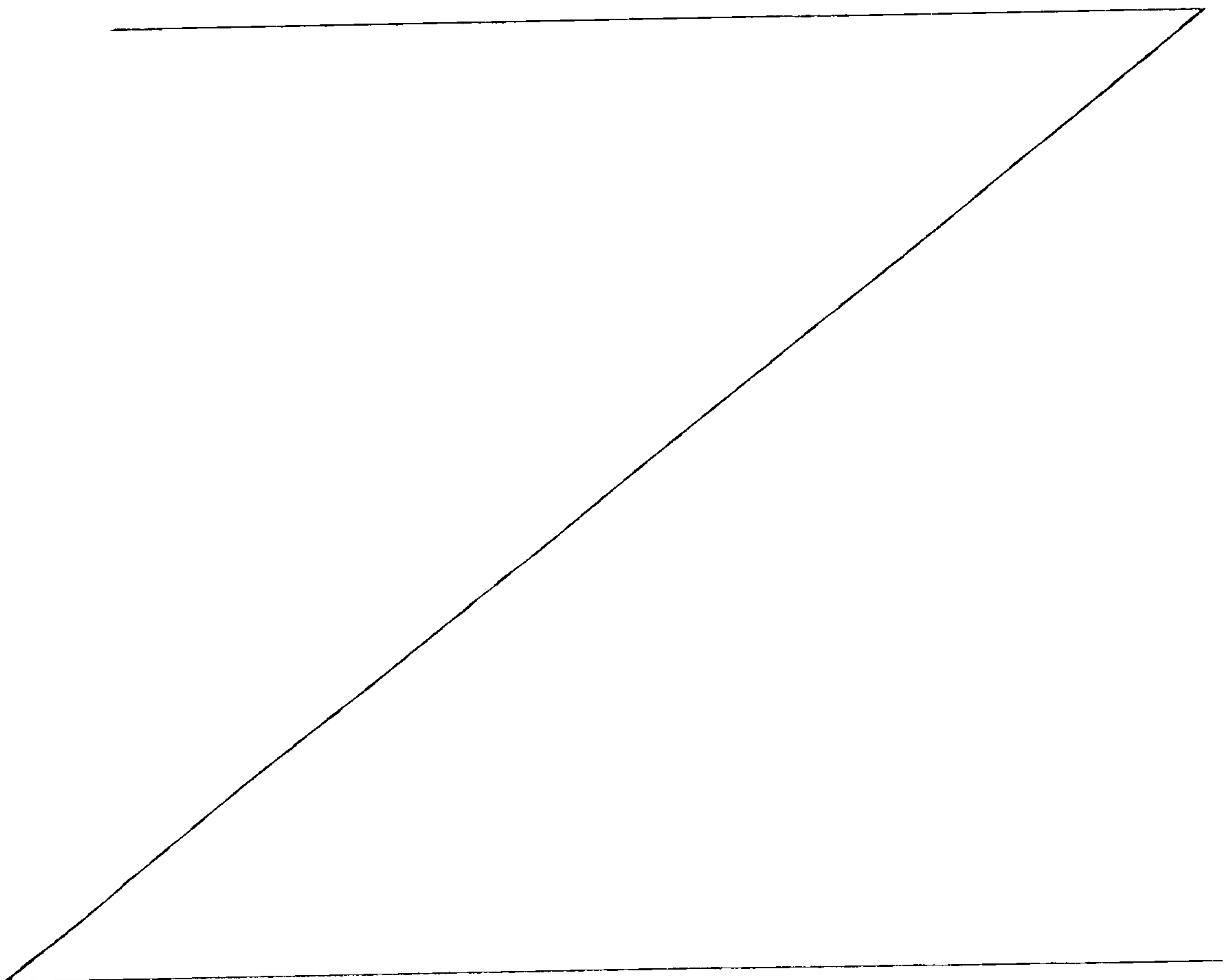
10

- des séquences nucléotidiques codant pour des régions variables de chaînes α des récepteurs des lymphocytes T humains correspondant à des ADNC correspondant à tout ou partie des séquences nucléotidiques choisies parmi l'un quelconque des segments Va correspondant à l'une des séquences

1 à 200 de SEQ ID N° 1

1 à 467 de SEQ ID N° 6

1 à 77 de SEQ ID N° 7



1 à 151 de SEQ ID N° 8

291 à 386 de SEQ ID N° 9

1 à 260 de SEQ ID N° 10

et les séquences qui en diffèrent par un ou deux nucléotides,

5 - des séquences nucléotidiques codant pour des régions variables de chaînes α des récepteurs des lymphocytes T humains correspondant à des ADNc correspondant à tout ou partie de la séquence nucléotidique correspondant à la SEQ ID N° 11 et qui comprennent le nucléotide 108,

10 - des séquences nucléotidiques codant pour des régions variables de chaînes α des récepteurs des lymphocytes T humains correspondant à des ADNc correspondant à tout ou partie des séquences nucléotidiques choisies parmi l'un quelconque des segments J α correspondant à l'une des séquences
15 SEQ ID N° 12, 13 et 15 à 20 et les séquences qui en diffèrent par un ou deux nucléotides.

Par l'expression "séquences nucléotidiques correspondant à des ADNc correspondant à tout ou partie des séquences nucléotidiques", on désigne aussi bien les séquences complètes
20 que des fragments de ces séquences y compris des fragments courts (oligonucléotides) qui trouvent des applications en tant que sondes (comportant généralement au moins 10 nucléotides) ou en tant qu'amorce (comportant généralement au moins 15 nucléotides). D'une manière générale, l'invention englobe
25 l'ensemble des nouveaux oligonucléotides qui sont des fragments des séquences V α et J α selon l'invention.

Quant aux séquences qui diffèrent par un ou deux nucléotides, elles correspondent à des variations que l'on a observé expérimentalement lors de la détermination de la séquence
30 nucléotidique de plusieurs ADNc.

La présente invention a également pour objet les peptides codés par des séquences nucléotidiques selon l'invention ainsi que les allèles et les dérivés de ceux-ci qui possèdent la même fonction.

35 La présente invention a également pour objet les peptides constitués par ou comprenant une séquence peptidique codée par tout ou partie de la séquence 108 à 364 de SEQ ID N° 11.

D'une manière générale, la présente invention englobe les

peptides constitués par ou comprenant une séquence peptidique codée par les séquences nucléotidiques selon l'invention ainsi que les fragments de ces peptides. Elle englobe également les peptides qui diffèrent de ceux-ci d'un ou plusieurs

5 amino-acides et qui possèdent la même fonction. Ces peptides peuvent correspondre à des modifications telles que celles connues avec les mutéines ou à des variations alléliques. Il a été en effet montré en particulier que certains segments géniques codant pour des régions variables de chaînes du
10 récepteur T chez l'homme étaient soumis à un phénomène de polymorphisme génétique appelé variation allélique (25). La présente invention englobe les peptides provenant de ce phénomène.

Les séquences nucléotidiques selon l'invention ont été
15 obtenues selon les étapes suivantes :

- isolement des ARN de lymphocytes périphériques d'un individu ;
- obtention de l'ADN complémentaire à l'aide de reverse transcriptase et d'une amorce A spécifique de la région C α
20 (SEQ ID N° 21) ;
- amplification génique (par Anchored Polymerase Chain Reaction ou A-PCR) à l'aide d'une ADN polymérase, d'une amorce poly C (SEQ ID N° 22) et d'une amorce B spécifique de la région C α (SEQ ID N° 23) ;
- 25 - nouvelle amplification par A-PCR à l'aide de ADN polymérase et d'une amorce C spécifique de la région C α (SEQ ID N° 24) ;
- insertion dans un vecteur plasmidique ;
- transformation d'un hôte bactérien avec le vecteur
30 recombinant ;
- criblage des colonies bactériennes recombinantes avec un oligonucléotide D spécifique de C α (SEQ ID N° 25) marqué ;
- extraction des plasmides des colonies positives,
- et séquençage des fragments d'ADN contenant la région
35 C α .

La présente invention peut être reproduite notamment par amplification génique bispécifique (polymerase chain reaction ou PCR) en partant des lymphocytes périphériques expriment les

ARNm incluant les segments variables ou jonctionnels correspondant aux séquences ID N° 1 à 13 et 15 à 20 de l'invention ou alternativement en appliquant cette technique de PCR à de l'ADN génomique de toute cellule somatique d'un individu pris
5 au hasard. L'invention peut aussi bien être reproduite en préparant les séquences géniques ci-dessus par synthèse chimique d'oligonucléotides.

Les peptides selon l'invention peuvent être obtenus par synthèse peptidique classique. Ils peuvent être également
10 obtenus par application des techniques connues de génie génétique comprenant l'insertion d'une séquence d'ADN codant pour un peptide selon l'invention dans un vecteur d'expression tel qu'un plasmide et la transformation de cellules avec ce vecteur d'expression.

15 La présente invention a donc également pour objet des plasmides et des vecteurs d'expression comprenant une séquence d'ADN codant pour un peptide selon l'invention ainsi que des hotes transformés avec ce vecteur.

La présente invention a également pour objet des anti-
20 corps, et notamment des anticorps monoclonaux, dirigés contre un déterminant antigénique appartenant à ou comprenant un peptide selon l'invention.

Les anticorps monoclonaux peuvent être obtenus par toutes les techniques qui permettent la production de molécules
25 d'anticorps à partir de culture de lignée cellulaire. Ces techniques comprennent les différentes techniques utilisant des hybridomes.

La production d'anticorps peut être obtenue chez l'animal par immunisation des animaux par injection des peptides ou des
30 fragments selon l'invention, qu'ils soient naturels, recombinants ou synthétiques, éventuellement après couplage à un agent immunogène tel que l'anatoxine tétanique, ou encore par injection des lymphocytes T humains exprimant les séquences correspondantes à leur surface, y compris des cellules
35 recombinantes transfectées avec les séquences codantes correspondantes.

Selon un mode de réalisation préférentiel, la présente invention a également pour objet des hybridomes produisant des anticorps monoclonaux dirigés contre les polypeptides selon l'invention.

De façon préférée, la présente invention englobe également les fragments et les dérivés d'anticorps monoclonaux selon l'invention qui sont réactifs avec des régions variables définies des récepteurs des cellules T. Ces fragments sont notamment les fragments F (ab')₂ qui
10 peuvent être obtenus par clivage enzymatique des molécules d'anticorps avec la pepsine, les fragments Fab' qui peuvent être obtenus par réduction des ponts disulfure des fragments F(ab')₂ et les fragments Fab qui peuvent être obtenus par clivage enzymatique des molécules d'anticorps avec la papaine en présence d'un agent réducteur. Ces fragments peuvent être également obtenus par génie génétique.

Les dérivés d'anticorps monoclonaux sont par exemple des anticorps ou des fragments de ces anticorps auxquels sont liés des marqueurs tel qu'un radioisotope. Les
20 dérivés d'anticorps monoclonaux sont également des anticorps ou des fragments de ces anticorps auxquels sont liées des molécules thérapeutiquement actives, notamment des composés cytotoxiques.

Les produits de l'invention trouvent plusieurs types d'application dans le domaine du diagnostic et dans le domaine de la thérapeutique.

1 - Les applications dans le domaine du diagnostic

Les oligonucléotides contenus dans les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent être utilisés pour
30 constituer des sondes de détection (généralement au moins 10 nucléotides) capables de s'hybrider à une région variable de chaîne α ou des amorces pour l'amplification d'ADN

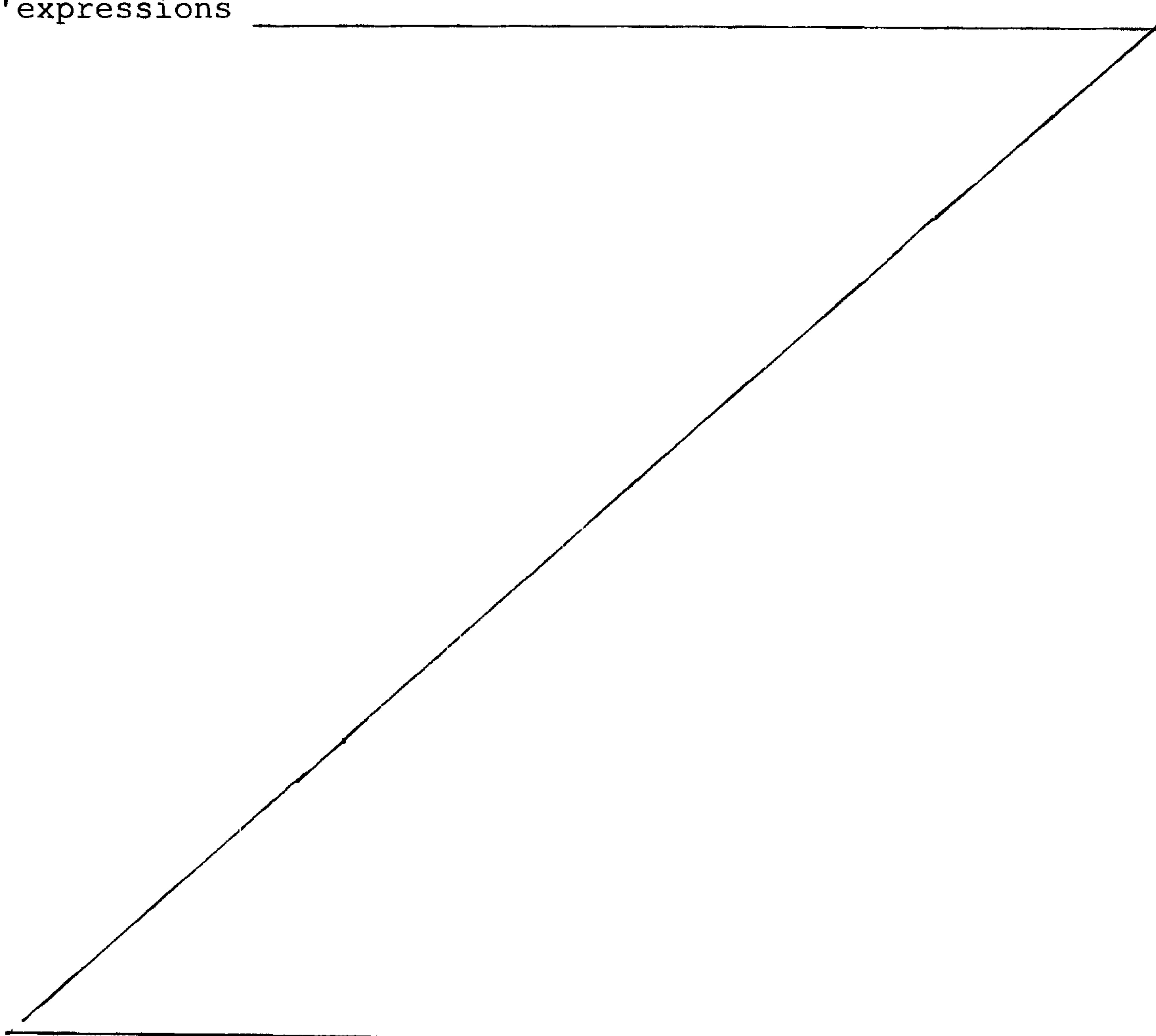
7a

(comportant généralement au moins 15 nucléotides et de préférence au moins 17 nucléotides) capables de se lier à une séquence à amplifier.

Les oligonucléotides trouvent ainsi une application dans le diagnostic des désordres immunitaires en détectant la présence de séquences d'acides nucléiques homologues d'un gène codant pour des régions variables de chaînes α des récepteurs des cellules T dans l'ARNm d'un échantillon d'un patient.

10 Différentes méthodes peuvent être utilisées pour établir un lien entre l'expression des gènes des cellules T et une maladie. Ces méthodes comprennent:

a - la production et l'analyse de banques d'expressions



d'ADNc obtenu à partir de cellules T liées à la maladie pour déterminer la fréquence de gènes dominants ;

b - l'analyse d'échantillons d'ADN génomique par Southern blot pour déterminer s'il existe des polymorphismes génétiques ou des réarrangements des gènes codant pour les récepteurs des cellules T ;

c - l'analyse d'échantillons par obtention d'ADNc, amplification par PCR et hybridation avec des sondes marquées ;

d - l'hybridation in situ de cellules T sans culture préalable des cellules T.

Les amorces trouvent une application dans des réactions de PCR dans une méthode telle que celle définie sous c ci-dessus.

Les anticorps monoclonaux, les fragments ou les dérivés de ces anticorps selon l'invention, notamment les anticorps anti $V\alpha$, peuvent être utilisés pour étudier des réponses immunitaires de type T, par exemple dans le domaine des maladies auto-immunes de la cancérologie, de l'allergie, de la transplantation et des maladies infectieuses. En particulier, le répertoire des différents segments variables α du récepteur T peut être étudié, qu'il s'agisse de cellules T du sang ou des tissus. D'une manière générale, les techniques utilisées peuvent être des méthodes in vitro ou in vivo.

Dans les méthodes in vitro, les échantillons utilisés peuvent être des échantillons de fluides corporels ou des échantillons de tissus. Les techniques utilisées peuvent inclure notamment la cytofluorimétrie de flux pour analyser les lymphocytes T du sang ou des marquages par immunopéroxydase sur coupe anatomopathologique pour étudier les lymphocytes infiltrant les tissus.

Dans les méthodes in vivo, les anticorps, leurs fragments ou leurs dérivés sont administrés par les voies habituelles, par exemple par la voie intraveineuse, et l'on détecte les liaisons immuno-spécifiques. Ceci peut être obtenu par exemple dans le cas où l'on utilise un anticorps marqué par un radio-isotope.

2 - Les applications dans le domaine thérapeutique

Les oligonucléotides contenus dans les séquences nucléo-

tidiques selon l'invention peuvent être utilisés en thérapeutique comme oligonucléotides antisens. On sait en effet qu'il est possible in vitro d'inhiber l'expression d'un gène transcrit dans des lymphocytes humains en incubant ces lymphocytes avec un oligonucléotide antisens spécifique du gène en question (26). Ces oligonucléotides antisens comprennent généralement au moins 10 et, de préférence, au moins 16 nucléotides. Ces oligonucléotides antisens peuvent être notamment les séquences inversées et complémentées correspondant aux 20 nucléotides en amont du site d'initiation de la traduction (ATG). L'intérêt d'une utilisation in vitro d'oligonucléotides antisens spécifique d'un segment génique $V\alpha$ ou $J\alpha$ est d'abolir (ou de diminuer fortement) l'expression d'un récepteur T comprenant ce segment $V\alpha$ ou $J\alpha$ et donc d'obtenir un phénomène de délétion clonale au niveau de la réactivité spécifique des lymphocytes T. Les oligonucléotides antisens peuvent non seulement être utilisés in vitro sur des lymphocytes T humains qui sont ensuite réinjectés, mais également in vivo par injection locale ou systémique de préférence après modifications pour augmenter la stabilité in vivo et la pénétration à l'intérieur des lymphocytes T de ces oligonucléotides.

Les anticorps monoclonaux selon l'invention, notamment les anticorps anti $V\alpha$, peuvent être utilisés pour moduler le système immunitaire. C'est ainsi que les anticorps peuvent être administrés pour bloquer l'interaction des cellules T effectrices avec leur antigène spécifique. On peut également administrer des anticorps anti-récepteurs T liés par exemple à une molécule cytotoxique ou à un radioisotope de façon à obtenir une délétion clonale, grâce à la fixation spécifique sur une chaîne α d'un récepteur de cellule T. Les anticorps monoclonaux selon l'invention peuvent être utilisés en thérapeutique à des concentrations faiblement mitogéniques de façon à activer de façon spécifique certains sous-ensembles de cellules T ou peuvent être utilisés à des concentrations beaucoup plus élevées pour se fixer aux récepteurs concernés et ainsi marquer ces sous-ensembles en vue de leur élimination par le système réticulo-endothélial. Un critère important pour

le traitement d'une maladie est l'aptitude à moduler des sous-ensembles de cellules T liées à une maladie. La nature exacte de cette modulation thérapeutique, à savoir bloquer ou supprimer un sous-ensemble particulier de cellules T ou au contraire stimuler et activer un sous-ensemble particulier, dépendra de la maladie en question et du sous-ensemble spécifique de cellules T concerné.

Ce type de traitement présente un avantage par rapport aux traitements actuels utilisant des anticorps tels que le traitement par des anticorps anti CD3 chez des patients ayant subi une transplantation rénale et ayant un problème de rejet, étant donné que grâce à l'invention il n'y aura pas de modulation de la totalité de la population des cellules T mais seulement du sous-ensemble de cellules T exprimant la sous-famille α particulière de récepteurs de cellules T.

Par ailleurs, la réponse des cellules T étant souvent oligoclonale, il convient généralement d'utiliser en thérapeutique des "cocktails" de plusieurs anticorps.

On peut en outre utiliser les anticorps anti $V\alpha$ pour sélectionner in vitro des lymphocytes T, par exemple par passage sur une colonne contenant des billes portant l'anticorps. Cette séparation de certains lymphocytes T peut être utilisée en vue d'une mise en culture de ces lymphocytes avant de les réinjecter au patient.

En outre, on peut utiliser en thérapeutique tout ou partie des séquences peptidiques selon l'invention, c'est-à-dire les séquences peptidiques codées par les séquences nucléotidiques selon l'invention ou les fragments de ces séquences (comprenant généralement au moins 8 à 10 aminoacides). Ces séquences ou ces fragments, administrés à l'homme ou à l'animal, peuvent agir en tant que leurre, c'est-à-dire qu'ils vont se fixer sur l'épitope porté par l'antigène néfaste et empêcher la réaction des cellules T normales avec l'antigène, en empêchant ainsi le développement d'une maladie agressive contre les déterminants du soi. Ils peuvent aussi être utilisés en tant qu'immunogènes dans la fabrication de vaccins (éventuellement après couplage à des porteurs protéiques).

On décrira ci-après plus en détail la présente invention, en se reportant aux Fig. annexées sur lesquelles :

- les Fig. 1 A à E donnent en alignement à la fois une séquence V α connue et une séquence partielle d'une extension
5 selon l'invention pour les séquences respectives SEQ ID N° 6 à 10, notées IGRa 08 à IGRa 12. Sur ces Figures, la numérotation des nucléotides commence au codon ATG d'initiation (qui est souligné). Les points indiquent les nucléotides identiques. Les séquences qui sont supposées être des séquences leader
10 sont surlignées.

- La Fig. 2 donne en alignement les nouvelles séquences J α (SEQ ID N° 12, 13 et 15 à 20) notées IGRJa 01, 02 et 04 à 09. Dans ces séquences les signaux de recombinaison de la lignée germinale sont soulignés. Les aminoacides correspondant
15 aux codons hautement conservés sont marqués au-dessus des séquences. Les codons correspondant à une substitution en une position d'un aminoacide conservé sont doublement soulignés.

- La Fig. 3 donne les analyses par Southern blot de l'ADN génomique traité par une enzyme de restriction en utilisant
20 des sondes spécifiques des séquences SEQ ID N° 1 à 5. Les enzymes de restriction utilisées sont EcoRI (colonne R), Hind III (colonne H) et Bam III (colonne B). Sur cette Figure, les triangles marquent la position des fragments d'ADN s'hybridant de façon spécifique avec C α .

25 - La Fig. 4 représente la détection par autoradiographie des transcrits amplifiés des chaînes α du TCR exprimé par les lymphocytes périphériques d'un individu sain et du contrôle β -actine, co-amplifié.

30 I - Obtention de l'ADNc et amplification par PCR

On a utilisé comme source d'ARN des lymphocytes périphériques d'un individu. L'ARN total a été préparé selon la méthode à l'isothiocyanate de guanidinium et au chlorure de
35 césium (Chirgwin (10)) ou selon la méthode en une seule étape par extraction avec de l'isothiocyanate de guanidinium, du phénol et du chloroforme (Chomczynski (11)).

Le premier brin d'ADNc a été synthétisé dans un volume

final de 50 microlitres à une température de 42°C pendant 1 heure en utilisant 5 microgrammes d'ARN total, la reverse transcriptase et une amorce A spécifique de la région C α constituée par la séquence 5'-GTTGCTCCAGGCCACAGCACTG (SEQ ID N° 21). Ce matériau a été ensuite purifié par extraction au phénol/chloroforme et précipitation à l'acétate d'ammonium. Après sélection d'une fraction 0,45/1 kb sur gel d'agarose, on a réalisé l'addition d'une extrémité dG sur l'hétéro duplex ARN/ADNc dans un tampon d'addition CoCl₂ avec 14 unités de terminal désoxynucléotidyl transférase (Tdt) pendant 30 mn à 37° C. La réaction a été stoppée par maintien à 70° C pendant 10 mn. NaOH 1N (1/3 de volume) a été ajouté et l'échantillon a été mis à incuber à 50° C pendant 1 heure pour hydrolyser l'ARN puis a été neutralisé avec du Tris HCl 2M pH 8 et HCl 1N. Après extraction par un mélange phénol/ chloroforme le premier brin d'ADNc à extrémité G a été précipité avec de l'éthanol et soumis à une amplification en utilisant la technique PCR (Polymerase Chain Reaction décrite par Saiki et al. (12)) dans un volume final de 100 microlitres contenant 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-Cl pH 8.3, 1,5 mM de MgCl₂, 0,1 % (poids/ volume) de gélatine, 200 micromoles de dNTP, 2,5 unités de Taq polymérase et 100 picomoles de deux amorces. Les deux amorces utilisées sont, d'une part, une amorce poly-C (5'-GCATGCGCGCGG CCGCGGAGG-14C) (SEQ ID N° 22) décrite par Loh et al. (13) ainsi qu'une amorce B spécifique de la région C α (5'-GTCCATAGACCTC ATGTCCAGCACAG) (SEQ ID N° 23).

On effectue 25 cycles d'amplification suivis par une période de 15 mn d'élongation finale à 72° C. Chaque cycle comprend une étape de dénaturation à 92° C pendant 1 minute, une étape d'hybridation à 55° C pendant 2 mn et une période d'élongation à 72° C pendant 4 mn. Les produits amplifiés sont ensuite précipités par de l'éthanol, remis en suspension dans de l'acétate de sodium 30 mM pH5, NaCl 50 mM, ZnCl₂ 1 mM, glycérol 5 % en volume, et 1/10 de ce matériau est purifié en fonction de la taille sur un gel d'agarose à bas point de fusion 1 %.

Une seconde phase d'amplification est ensuite réalisée directement sur approximativement 10 % de la bande contenant

l'agarose en suivant les mêmes conditions que précédemment, sauf qu'on utilise comme amorce C spécifique de la région Cα l'amorce 5'-ATACACATCAGAATTC TTA CTTTG (SEQ ID N° 24). Le mélange de réaction est ensuite précipité par l'éthanol et 5 remis en suspension dans 60 µl H₂O.

II - Clonage et séquençage des ADNc

1/3 du produit de la seconde amplification est mis à 10 digérer avec Sac II, séparé sur gel d'agarose 1 % et purifié par adsorption sur des billes de verre. Le matériau est inséré dans le vecteur Bluescript SK+ (Stratagene, La Jolla, U.S.A.) et les recombinants obtenus sont utilisés pour transformer des souches XL1-bleu de E. Coli (Stratagene). Après dépôt en 15 présence de X-gal et IPTG, on fait un test sur les colonies blanches en utilisant une technique "dot blot" et comme sonde un troisième oligonucléotide spécifique de la région Cα (5'-GTCACTGG ATTTAGAGTCT) (SEQ ID N° 25) marqué au ³²P. On extrait l'ADN plasmidique des colonies positives et on 20 séquence sur les deux brins par le procédé par terminaison de chaîne didésoxy (Sanger et al. (14)) avec de la Sequenase 2,0 (United States Biochemicals, Cleveland, Etats-Unis) en suivant les recommandations du fournisseur. Sauf pour la séquence SEQ ID N° 5, toutes les séquences nucléotidiques ont été détermi- 25 nées sur les deux brins en utilisant au moins deux clones distincts d'ADNc.

Les séquences obtenues ont été comparées aux séquences publiées Vα et Jα en utilisant la méthode développée par Lipman et Pearson (15). Les codons de départ présumés ont été 30 identifiés en recherchant la présence de la séquence consensus Kozak pour les sites d'initiation des traductions dans les cellules eucaryotes (Kozak (16)). La présence de séquences leader hydrophobes du côté N-terminal a été décelée par analyse de l'hydrophobicité selon la méthode décrite par Kyte 35 (17).

III - Analyse par Southern blot

L'ADN a été extrait de la lignée cellulaire érythroleucémique humaine K562 et mis à digérer avec l'une des enzymes de restriction suivantes : EcoR I, BamH I ou Hind III. L'ADN (15 microgrammes) a été soumis à une électrophorèse sur agarose 5 0,7 % et a été transféré sur des membranes de Nylon comme décrit par Triebel et al. (18). Les hybridations ont été réalisées à 65° C avec 6 x SSC, 0,5 % de SDS, 5 x Denhardt's et 100 microgrammes d'ADN de sperme de saumon dénaturé pendant 16 heures. Les membranes ont été lavées à 65° C avec 2 x SSC, 10 0,2 % de SDS.

On a utilisé comme sondes V α spécifiques des sondes obtenues par amplification d'ADNc V-J-C (> 500 bp) comprenant des fragments V α correspondant aux séquences SEQ ID N° 1 à 5 en utilisant comme amorce l'amorce poly-C et l'amorce C. 15 Les sondes ont été purifiées sur gel d'agarose 1 %. Des sondes d'ADN marquées au ³²P ont été préparées à partir des fragments purifiés sur agarose par la méthode de Feinberg (19).

IV - Résultats

20

En utilisant la méthode A-PCR, 308 ADNc qui hybrident avec la sonde C α ont été clonés, puis séquencés. Parmi ceux-ci, 172 ADNc correspondent à des régions variables V-J-C α uniques.

25

Les séquences V α et J α de l'invention figurent dans la liste des séquences respectivement sous les SEQ ID N° 1 à 11 et SEQ ID N° 12, 13 et 15 à 20. Les séquences SEQ ID N° 2 à 5 correspondent à des sous familles nouvelles (dénommées respectivement V α 25, V α 26, V α 27 et V α 29) tandis que les 30 séquences SEQ ID N° 1 et 6 à 11 correspondent à des extensions de segments V α connus.

1. Séquences V α correspondant à des sous-familles nouvelles

Les analyses par Southern blot d'ADN de lignée germinale 35 soumis à une digestion par les endonucléases, en utilisant des sondes V-J-C α comprenant des fragments V α correspondant aux séquences SEQ ID N° 2 à 5 ont été réalisées dans des conditions d'hybridation de "faible stringence" pour identifier le

nombre de segments géniques $V\alpha$ appartenant à chaque famille et pour caractériser des fragments de restriction d'ADN portant ces segments géniques $V\alpha$. Des résultats représentatifs sont reportés sur la Figure 3.

- 5 Ces analyses montrent que la sous famille correspondant à la séquence SEQ ID N° 3 comprend au moins deux segments géniques alors que les autres séquences (SEQ ID N° 2, N° 4 et N° 5) correspondent probablement à des membres uniques.

10 Les tailles des fragments de restriction de l'ADN germinaux sont les suivantes :

SEQ ID N° 2 : EcoR I 2,2 kb, Hind III 4,8 et 5,7 kb,
BamH I 25 kb

SEQ ID N° 3 : EcoR I 4,6 et 7,5 kb, Hind III 4,2 et
6,4 kb, BamH I 23 et 4,5 kb

- 15 SEQ ID N° 4 : EcoR I 7,6 kb, Hind III 18 kb, BamH I 9
et 0,9 kb

SEQ ID N° 5 : ECOR I 5,9 et 4,8 kb, Hind III 6,6 kb,
BamH I 6,5 kb.

20 **2. Séquences correspondant à des extensions de séquences $V\alpha$ connues**

SEQ ID N° 1 (IGR a 02) correspond à une extension du côté 5' de la séquence LINV (171 bp) (Mengle-Gaw (20)) : Cette séquence définit la sous-famille dénommée provisoirement $V\alpha$ w24.

- 25 SEQ ID N° 6 (IGR a 08) : Cette séquence correspond à une extension du côté 5' de la séquence du clone $V\alpha$ 1 AE11 (Klein et al. (21)). Les deux séquences alignées sont représentées sur la Figure 1A.

- 30 SEQ ID N° 7 (IGR a 09) : Cette séquence correspond à une extension codant pour l'extrémité NH2 terminale de la séquence $V\alpha$ 2 AF110 (Klein déjà cité). Les deux séquences alignées sont représentées sur la Fig. 1B. La séquence ID N° 7 correspond à une séquence consensus. On a observé en position 206 l'existence d'un T au lieu d'un C.

- 35 SEQ ID N° 8 (IGR a 010) : Cette séquence correspond à une extension de la région 5' du clone $V\alpha$ HAP35 (Yoshikai (22)). Les deux séquences alignées sont représentées sur la Fig. 1C. La séquence ID N° 8 correspond à une séquence consensus. On a

observé en position 307 l'existence d'un G au lieu d'un A et en position 360 l'existence d'un T au lieu d'un C.

SEQ ID N° 9 (IGR a 11) : Cette séquence correspond à une extension du côté 3' de la séquence V α 7 HAP12 (Yoshikai déjà cité). L'alignement des séquences est représenté sur la Fig. 1D. La séquence ID N° 9 correspond à une séquence consensus.

On a observé en position 86 l'existence d'un C au lieu d'un T.

SEQ ID N° 10 (IGR a 12) : Cette séquence comprend la région codante complète d'un gène de la sous famille V α 22 qui précédemment avait été identifié par la séquence partielle (113 bp) AC9 (Klein déjà cité). Les deux séquences alignées sont représentées sur la Fig. 1E.

SEQ ID N° 11 (IGRa 13) : Cette séquence correspond pour une partie aux clones HAVT 32 et HAVT 35 (appartenant à la sous-famille V α 16 (8) et qui ont été décrits comme des pseudo-gènes. En fait, par suite de l'addition d'un nucléotide en position 108, la SEQ ID N° 11 code pour une région variable originale d'un récepteur des lymphocytes T. Par ailleurs, cette séquence est homologue d'une séquence HSTCAYM (Klein et al. (21)) pour la partie codante. Toutefois la séquence SEQ ID N° 11 est la seule qui soit complète et codante.

3. Séquences J α

On a représenté sur la Fig. 2 l'ensemble des nouvelles séquences J α . Parmi les 8 segments J α , la plupart d'entre eux présentent une séquence d'acides aminés hautement conservée FGXGT des segments J α comme décrit par Yoshikai déjà cité. Cependant, pour le segment IGRJa 07 le résidu thréonine est remplacé par un résidu isoleucine.

De plus, à la place du résidu phénylalanine, on a trouvé un résidu cystéine dans IGRJa 02G.

La présente invention vise également à fournir des oligonucléotides spécifiques des différentes sous-familles V α , qui sont utilisables comme amorces pour l'amplification d'ADN correspondant à ces différentes sous-familles V α , en vue par exemple d'une étude de l'expression de certaines sous-familles V α chez un patient et finalement d'un diagnostic des troubles immunitaires, comme indiqué plus haut.

L'expression prédominante de certaines sous-familles de $V\alpha$ a déjà été étudiée à l'aide d'une gamme incomplète d'oligonucléotides. Ainsi, Nitta et al. (29) ont décrit l'expression prédominante des gènes $V\alpha$ 7 dans les lymphocytes infiltrant 5 les tumeurs. Par ailleurs, Sottini et al. (30) ont décrit chez des patients atteints d'arthrite rhumatoïde l'étude du répertoire des $V\alpha$.

La présente invention vise à fournir une gamme complète d'oligonucléotides permettant l'étude à la fois des 10 sous-familles $V\alpha$ connues et des nouvelles sous-familles $V\alpha$ de l'invention et qui soient tout-à-fait spécifiques de chaque sous-famille. Les oligonucléotides ont donc été choisis et synthétisés dans ce but et au besoin des modifications de un ou deux nucléotides ont été introduites par rapport aux 15 séquences naturelles pour réduire les réactivités croisées entre sous-familles.

La présente invention a ainsi également pour objet des oligonucléotides, utilisables comme amorces pour l'amplification d'ADN correspondant à des régions variables de chaînes α 20 des récepteurs de cellules T, choisis parmi les séquences SEQ ID N° 26 à 54.

La présente invention a également pour objet l'utilisation, comme amorces pour l'amplification d'ADN correspondant à des régions variables de chaînes α des récepteurs de cellules 25 T, d'oligonucléotides choisis parmi les séquences SEQ ID N° 26 à 54.

La présente invention a également pour objet un procédé de détection de séquences nucléotidiques codant pour des segments $V\alpha$ des récepteurs T ou d'ADNc correspondant aux 30 produits de transcription de celles-ci, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend :

- a) l'amplification de l'ADN avec au moins une paire d'amorces formée par un oligonucléotide choisi parmi les séquences SEQ ID N° 26 à 54 et un oligonucléotide appartenant au segment $C\alpha$, 35 et
- b) la détection des séquences amplifiées avec une sonde $C\alpha$.

L'oligonucléotide appartenant au segment $C\alpha$ utilisé pour l'amplification peut être notamment choisi parmi les séquences

SEQ ID N° 55 et 56.

Pour contrôler l'efficacité de l'amplification, on opère
avantageusement en présence d'une paire d'amorces contrôle et
on détecte la séquence contrôle correspondante amplifiée à
5 l'aide d'une sonde contrôle correspondante.

Cette paire d'amorces contrôle peut correspondre à deux
segments C β , par exemple les amorces C β F et C β K correspondant
aux séquences SEQ ID N° 61 et 62. On utilise alors une sonde
de détection C β (correspondant par exemple à la séquence SEQ
10 ID N° 63). Mais cette paire d'amorces peut être également
constituée par deux amorces appartenant à la β -actine, notam-
ment celles correspondant aux séquences SEQ ID N° 58 et 59. On
utilise alors une sonde de détection correspondant à une
séquence de la β -actine, telle que la séquence SEQ ID N° 60.

15 La présente invention a également pour objet un kit de
diagnostic pour la mise en oeuvre du procédé précédemment
défini, qui comprend :

- a) au moins un oligonucléotide choisi parmi les séquences SEQ
ID N° 26 à 54,
- 20 b) une amorce C α ,
- c) une sonde C α .

Un tel kit contient avantageusement en outre:

- d) une paire d'amorces contrôle,
 - e) une sonde contrôle.
- 25 Ce kit peut notamment comprendre :
- a) l'ensemble des 29 oligonucléotides correspondant aux
séquences SEQ ID N° 26 à 54,
 - b) une amorce C α choisis parmi les séquences correspondant aux
séquences SEQ ID N° 55 et 56,
 - 30 c) une paire d'amorces contrôle pour la β -actine ayant une
séquence correspondant respectivement aux séquences SEQ ID N°
58 et 59,
 - d) une sonde C α correspondant à la séquence SEQ ID N° 57,
 - e) une sonde contrôle pour la β -actine correspondant à la
35 séquence SEQ ID N° 60.

Dans l'information donnée dans la liste des séquences
pour les séquences 26 à 60, les séquences SEQ ID N° 26 à 47
correspondent à des séquences appartenant à des clones de

sous-familles connues V α 1 à V α 22 (accessibles dans la base de données EMBL) ou à des séquences qui en diffèrent par un ou deux nucléotides.

Les séquences SEQ ID N° 49, 50, 51, 52 et 54 correspondent à des séquences appartenant à des clones de nouvelles sous-familles de l'invention, correspondent à des sous-familles dénommées provisoirement V α w24, V α w25, V α w26, V α w27 et V α w29 (w indiquant que la désignation est dans l'attente d'une désignation définitive).

10 Les séquences SEQ ID N° 48 et 53 correspondent à des séquences appartenant à des clones respectivement IGRa01 et IGRa06 de sous-familles connues mais n'ayant pas encore reçu de désignation définitive (respectivement V α w23 et V α w28) dont un élément membre a déjà été décrit (respectivement
15 Hinkkanen A. et al. (31) et Bernard O. et al. (32)). La séquence complète de IGRa06 n'a pas encore été publiée.

Les séquences SEQ ID N° 55 et 56 sont deux exemples d'oligonucléotides qui peuvent être utilisés comme amorces C α pour l'amplification.

20 La séquence SEQ ID N° 57 est la séquence d'une sonde C α qui peut être utilisée pour la détection des ADN amplifiés.

Les séquences SEQ ID N° 58, 59 et 60 sont respectivement les séquences d'une paire d'oligonucléotides appartenant à la séquence de la β -actine qui peuvent être utilisées pour le
25 contrôle de l'amplification et la séquence d'une sonde pour détecter les ADN amplifiés correspondants.

Dans la liste des séquences, la position indiquée est la position de l'extrémité 5' à compter du site d'initiation prédictif de la traduction ATG. Dans le cas où les séquences
30 sont incomplètes (région 5' inconnue), la position (marquée avec un astérisque) est donnée par rapport au premier nucléotide de la séquence. Les nucléotides soulignés correspondent aux mésappariements introduits par rapport à la séquence naturelle.

35 Les oligonucléotides ont été synthétisés sur un synthétiseur d'ADN automatisé Applied Biosystems 381 A en utilisant la méthode au β -cyanoéthylphosphoramidite (Sinha et al. (33)) et en suivant le protocole recommandé par le fabricant. Les

oligonucléotides ont été détritylés dans l'appareil, clivés du support et déprotégés par l'ammoniac (à 60° C pendant 5 heures). Les produits bruts ont été purifiés par chromatographie haute pression en phase inversée sur une colonne de 5 μ -bondapak C 18 en utilisant un gradient d'acétonitrile (9 à 15 %) dans un tampon acétate de triéthylammonium 0,01 M à pH 5,5.

L'amplification effectuée en utilisant les amorces selon l'invention peut être notamment la technique par PCR (Polymerase Chain Reaction) telle que décrite par Saiki et al. (12) et brevets US-A-4 683 195, 4 683 202, 4 889 818.

Pour la PCR, on peut utiliser un ADN double brin que l'on dénature ou un ADNc obtenu à partir d'ARN à l'aide de reverse transcriptase comme mentionné plus haut.

15 L'agent de polymérisation est une ADN polymérase, notamment la Taq polymérase.

Généralement, le cycle d'amplification est répété 25 à 40 fois.

Les sondes que l'on utilise pour la détection des 20 séquences amplifiées peuvent être obtenues par marquage d'oligonucléotides avec un isotope radioactif, ce qui conduit à une détection par autoradiographie, ou par couplage avec une enzyme telle que la peroxydase (système ECL Amersham), la phosphatase alcaline ou la β -galactosidase (système Tropix 25 Ozyme), ce qui conduit à une détection par chimioluminescence.

L'exemple suivant illustre la mise en oeuvre du procédé de détection selon l'invention.

Les lymphocytes périphériques d'un individu sain ont été préparés par centrifugation sur un gradient de densité. L'ARN 30 total a été extrait selon la méthode en une seule étape par extraction avec de l'isothiocyanate de guanidium, du phénol et du chloroforme (Chomczynski, 11). L'ADN complémentaire a été synthétisé dans un volume final de 20 μ l à 42° C durant 1 heure en utilisant 1 à 5 μ g d'ARN total, la reverse trans- 35 criptase et l'amorce C α B (1,25 μ M).

Le matériel obtenu a ensuite été chauffé à 95° C durant 3 minutes avant d'être soumis à une amplification selon la technique PCR en utilisant en parallèle chacune des amorces V α

spécifique correspondant aux séquences SEQ ID N° 26 à 54 et l'amorce Cα B spécifique de la région Cα (SEQ ID N° 56). Cette amplification a été réalisée dans un volume final de 10 µl par tube contenant 50 mM de KCl, 10 mM de tris-HCl pH 8,3, 1,5 mM de MgCl₂ 0,1 % (poids/ volume) de gélatine, 200 µM de dNTP, 0,25 unités de Taq polymérase et 0,25 µM de chaque amorce. Dans chaque tube, une amplification contrôle a été réalisée à partir de 25 mM d'un fragment d'ADN de β-actine de 877 paires de bases préparé par PCR et des amorces Act 1 et Act 2 (SEQ ID N° 58 et 59) spécifiques de l'actine. 30 cycles d'amplification ont été effectués suivis d'une étape d'élongation finale de 5 minutes à 72° C. Chaque cycle comprenait une étape de dénaturation à 94° C pendant 1 minute, une étape d'hybridation à 65° C pendant 1 minute et une période d'élongation à 72° C pendant 1 minute.

Les produits obtenus ont été séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 2 %, transférés sur des membranes de nylon dans un tampon alcalin et hybridés simultanément avec les sondes oligonucléotides Cα C (SEQ ID N° 57) et Act 3 (SEQ ID N° 60) marquées au 32P par l'enzyme polynucléotidyl T4 kinase. L'hybridation a été réalisée à 42° C pendant 16 heures dans un tampon contenant 6 x SSC, 0,5 % SDS, 5 x Denhart's, 0,05 % PO₄H₂Na et 100 µg/ml d'ADN de sperme de saumon dénaturé. Les membranes ont ensuite été lavées avec du 6 x SSC, 20mM PO₄H₂Na, deux fois à température ambiante pendant 5 minutes et une fois à 50° C pendant 30 minutes puis autoradiographiées.

Les résultats sont montrés sur la figure 4.

Le contrôle d'actine (bande de 877 paires de bases) permet de vérifier l'amplification dans tous les puits. Il apparaît en-dessous de cette bande un signal spécifique dont la taille correspond à la taille des fragments amplifiés correspondants, chaque fragment ayant une longueur correspondant à la distance entre l'emplacement de l'oligonucléotide spécifique Vα et l'amorce Cα.

Chez l'individu testé, la Figure 4 met en évidence l'expression préférentielle de certains segments géniques définis par rapport à d'autres. Par exemple, les sous-familles

Vα 27, 28 et 29 sont moins bien représentées que les sous-familles Vα 2, 3 et 6.

REFERENCES :

1. Meuer, S.C., et al., J. Exp. Med. 1983. 157:705.
2. Moingeon, P., et al., Nature 1986a. 323:638.
3. Brenner, M.B., et al., Nature 1986. 322:145.
- 5 4. Bank, I., et al., Nature 1986. 322:179.
5. Davis, M.M., et al., Nature 1988. 334:395.
6. Crews, S., et al., Cell 1981. 25:59.
7. Concannon, P., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1986. 83:6598.
- 10 8. Kimura, N., et al., Eur. J. Immunol. 1987. 17:375.
9. Wilson, R.K., et al., Immunological Reviews 1988c. 101:149.
10. Chirgwin, J.M., et al., Biochemistry 1979. 18:5294.
- 15 11. Chomczynski, P. et al., Anal. Biochem. 1987, 162:156.
12. Saiki, R.K., et al., Science 1988. 239:487.
13. Loh, E.Y., et al., Science 1989. 243:217.
14. Sanger, F., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 20 1977. 74:5463.
15. Lipman, D.J., et al., Science 1985. 227:1435.
16. Kozak, M., Nucl. Acids Res. 1984. 12:857.
17. Kyte, J., et al., R.F., J. Mol. Biol. 1982. 157:105.
- 25 18. Triebel, F., et al., J. Immun. 1988. 140:300.
19. Feinberg, A.P., et al., Anal. Biochem. 1983. 132:6.
20. Mengle-Gaw, L., et al., The EMBO Journal, 1987. 6:2273.
- 30 21. Klein, M.H., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1987. 84:6884.
22. Yoshikai, Y., et al., J. Exp. med. 1986. 164:90.
23. Naudenbark A., et al., Nature, 341, 541.
24. Janeway C., Nature, 341, 482.
- 35 25. Lin Y., J. Exp. Med., 171, 221.
26. Acha-Orbea H., EMBO Journal, 1990, 9, 12, 3815.
27. Kappler J., Science, 244, 811
28. Choi, Y., PNAS, 86, 8941.

29. Nitta T. et al., Science 1990, 249, 672.
30. Sottini A. et al., Eur. J. Immunol., 1991, 21, 461.
31. Hinkkanen A. et al., Immunogenetics, 1989, 29, 131.
- 5
32. Bernard O. et al., Oncogene, 1988, 2, 195.
33. Sinha N. et al., Nucleic Acids Res. 1984, 12, 4539.

LISTE DES SEQUENCES

5

I - INFORMATION GENERALE

10

(1) DEMANDEUR : Société dite ROUSSEL UCLAF

(2) TITRE DE L'INVENTION :

15

Séquences nucléotidiques codant pour des
régions variables des chaînes α des récep-
teurs des lymphocytes T humains, segments
peptidiques correspondants et les applica-
tions diagnostiques et thérapeutiques.

20

(3) NOMBRE DE SEQUENCES : 62

II - INFORMATION POUR SEQ ID N° 1

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

5 TYPE : nucléotide et sa protéine corres-
pondante
LONGUEUR : 371 paires de bases
NOMBRE DE BRINS : simple
CONFIGURATION : linéaire
TYPE DE MOLECULE : ADNc pour ARNm

10 ORIGINE

ORGANISME : humain
LIGNEE CELLULAIRE : lymphocytes T humains

CARACTERISTIQUES

15 NOM DE L'ADN : IGR a 02
SEQUENCE Vα w24

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE

AGTCAACTTC TGGGAGCAGT CTCTGCAGAA TAAAA																47
Met Lys Lys His																
1																
CTG	ACG	ACC	TTC	TTG	GTG	ATT	TTG	TGG	CTT	TAT	TTT	TAT	AGG	GGG	AAT	95
Leu	Thr	Thr	Phe	Leu	Val	Ile	Leu	Trp	Leu	Tyr	Phe	Tyr	Arg	Gly	Asn	
5					10					15	Phe	Tyr	Arg	Gly	Asn	20
GGC	AAA	AAC	CAA	GTG	GAG	CAG	AGT	CCT	CAG	TCC	CTG	ATC	ATC	CTG	GAG	143
Gly	Lys	Asn	Gln	Val	Glu	Gln	Ser	Pro	Gln	Ser	Leu	Ile	Ile	Leu	Glu	
				25					30					35		
GGA	AAG	AAC	TGC	ACT	CTT	CAA	TGC	AAT	TAT	ACA	GTG	AGC	CCC	TTC	AGC	191
Gly	Lys	Asn	Cys	Thr	Leu	Gln	Cys	Asn	Tyr	Thr	Val	Ser	Pro	Phe	Ser	
				40					45					50		
AAC	TTA	AGG	TGG	TAT	AAG	CAA	GAT	ACT	GGG	AGA	GGT	CCT	GTT	TCC	CTG	239
Asn	Leu	Arg	Trp	Tyr	Lys	Gln	Asp	Thr	Gly	Arg	Gly	Pro	Val	Ser	Leu	
				55					60					65		
ACA	ATC	ATG	ACT	TTC	AGT	GAG	AAC	ACA	AAG	TGG	AAC	GGA	AGA	TAT	ACA	287
Thr	Ile	Met	Thr	Phe	Ser	Glu	Asn	Thr	Lys	Ser	Asn	Gly	Arg	Tyr	Thr	
				70					75					80		
GCA	ACT	CTG	GAT	GCA	GAC	ACA	AAG	CAA	AGC	TCT	CTG	CAC	ATC	ACA	GCC	335
Ala	Thr	Leu	Asp	Ala	Asp	Thr	Lys	Gln	Ser	Ser	Leu	His	Ile	Thr	Ala	
85					90					95					100	
TCC	CAG	CTC	AGC	GAT	TCA	GCC	TCC	TAC	ATC	TGT	GTG					371
Ser	Gln	Leu	Ser	Asp	Ser	Ala	Ser	Tyr	Ile	Cys	Val					
				105					110							

TYPE : nucléotide et sa protéine correspondante

NOMBRE DE BRINS : simple

TYPE DE MOLECULE : ADNc pour ARNm

LIGNEE CELLULAIRE : lymphocytes T humains

15 SEQUENCE Vα w25

GACTCTAAGC CCAAGAGAGT TTCTTGAAGC AAAAAAAAAA 40

AAAACCCATT CAGGAAATAA TTCTTTGCTG ATAAGG ATG CTC CTT GAA CAT TTA 94
Met Leu Leu Glu His Leu
1 5

TTA ATA ATC TTG TGG ATG CAG CTG ACA TGG GTC AGT GGT CAA CAG CTG 142
Leu Ile Ile Leu Trp Met Gln Leu Thr Trp Val Ser Gly Gln Gln Leu
10 15 20

AAT CAG AGT CCT CAA TCT ATG TTT ATC CAG GAA GGA GAA GAT GTC TCC 190
Asn Gln Ser Pro Gln Ser Met Phe Ile Gln Glu Gly Glu Asp Val Ser
25 30 35

ATG AAC TGC ACT TCT TCA AGC ATA TTT AAC ACC TGG CTA TGG TAC AAG 238
Met Asn Cys Thr Ser Ser Ser Ile Phe Asn Thr Trp Leu Trp Tyr Lys
40 45 50

CAG GAC CCT GGG GAA GGT CCT GTC CTC TTG ATA GCC TTA TAT AAG GCT 206
Gln Asp Pro Gly Glu Gly Pro Val Leu Leu Ile Ala Leu Tyr Lys Ala
55 60 65 70

GGT GAA TTC ACC TCA AAT GGA AGA CTC ACT GGT CAG TTT GGT ATA ACC 334
Gly Glu Leu Thr Ser Asn Gly Arg Leu Thr Ala Gln Phe Gly Ile Thr
75 80 85

AGA AAG GAC AGC TTC CTG AAT ATC TCA GCA TCC ATA CCT AGT GAT GTA 182
Arg Lys Asp Ser Phe Leu Asn Ile Ser Ala Ser Ile Pro Ser Asp Val
90 95 100

GGC ATC TAC TTC TGT GCT 400
Gly Ile Tyr Phe Cys Ala
105

IV - INFORMATION POUR SEQ ID N° 3

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

TYPE : nucléotide et sa protéine correspondante

LONGUEUR : 339 paires de bases

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : ADNC pour ARNm

10 ORIGINE

ORGANISME : humain

LIGNEE CELLULAIRE : lymphocytes T humains

CARACTERISTIQUES

NOM DE L'ADN : IGR a 04

15 SEQUENCE Vα w26

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE

[illegible]

V - INFORMATION POUR SEQ ID N° 4

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

5 TYPE : nucléotide et sa protéine correspondante

LONGUEUR : 335 paires de bases

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : ADNc pour ARNm

10 ORIGINE

ORGANISME : humain

LIGNEE CELLULAIRE : lymphocytes T humains

CARACTERISTIQUES

NOM DE L'ADN : IGR a 05

15 SEQUENCE Vα w27

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE

AGAAAAAAAA	AATGAAGAAG	CTACTAGCAA	TGATCCTGTG	GCTTCAACTA	50
GACCGGTAA	CTGGAGAGCT	GAAAGTG	GAA CAA AAC CCT CTG TTC	95	
			Glu Gln Asn Pro Leu Phe		
			1 5		
CTG ACC ATG CAG CAG GGA AAA AAC TAT ACC ATC TAC TGC AAT TAT TCA	143				
Leu Ser Met Gln Glu Gly Lys Asn Tyr Thr Ile Tyr Cys Asn Tyr Ser					
10 15 20					
ACC ACT TCA GAC AGA CTG TAT TGG TAC AGG CAG GAT CCT GGG AAA AGT	191				
Thr Thr Ser Asp Arg Leu Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Lys Ser					
25 30 35					
CTG GAA TCT CTG TTT GTG TTG CTA TCA AAT GGA GCA GTG AAG CAG GAG	239				
Leu Glu Ser Leu Phe Val Leu Leu Ser Asn Gly Ala Val Lys Gln Glu					
40 45 50					
GGA CGA TTA ATG GCC TCA CTT GAT ACC AAA GCC CGT CTC AGC ACC CTC	287				
Gly Arg Leu Met Ala Ser Leu Asp Thr Lys Ala Arg Leu Ser Thr Leu					
55 60 65 70					
CAC ATC ACA GCT GCC GTG CAT GAC CTC TCT GCC ACC TAC TTC TGT GCC	335				
His Ile Thr Ala Ala Val His Asp Leu Ser Ala Thr Tyr Phe Cys Ala					
75 80 85					

VI - INFORMATION POUR SEQ ID N° 5

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

5 TYPE : nucléotide et sa protéine correspondante

LONGUEUR : 361 paires de bases

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : ADNc pour ARNm

10 ORIGINE

ORGANISME : humain

LIGNEE CELLULAIRE : lymphocytes T humains

CARACTERISTIQUES

NOM DE L'ADN : IGR a 07

15 SEQUENCE Vα w29

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE

GAAGCTGACT GGATATTCTG GCAGGCCAAG G	ATG GAG ACT CTC CTG	46
	Met Glu Thr Leu Leu	
	1 5	
AAA GTG CCT TCA GGC ACC TTG TTG TGG CAG TTG ACC TGG GTG GGA AGC	94	
Lys Val Pro Ser Gly Thr Leu Leu Trp Gln Leu Thr Trp Val Gly Ser		
	10 15 20	
CAA CAA CCA GTG CAG AGT CCT CAA GCC GTG ATC CTC CGA GAA GGG GAA	142	
Gln Gln Pro Val Gln Ser Pro Gln Ala Val Ile Leu Arg Glu Gly Glu		
	25 30 35	
GAT GCT GTC ACC AAC TGC AGT TCC TCC AAG GCT TTA TAT TCT GTA CAC	190	
Asp Ala Val Thr Asn Cys Ser Ser Ser Lys Ala Leu Tyr Ser Val His		
	40 45 50	
TGG TAC AGG CAG AAG CAT GGT GAA GCA CCC GTC TTC CTC ATG ATA TTA	238	
Trp Tyr Arg Gln Lys His Gly Glu Ala Pro Val Phe Leu Met Ile Leu		
	55 60 65	
CTG AAG GGT GGA GAA CAG ATG CGT CGT GAA AAA ATA TCT GCT TCA TTT	286	
Leu Lys Gly Gly Glu Gln Met Arg Arg Glu Lys Ile Ser Ala Ser Phe		
	70 75 80 85	
AAT GAA AAA AAG CAG CAA AGC TCC CTC TAC CTT ACG GCC TCC CAG CTC	334	
Asn Glu Lys Lys Gln Gln Ser Ser Leu Tyr Leu Thr Ala Ser Gln Leu		
	90 95 100	
AGT TAC TCA GGA ACC TAC TTC TGC GGG	361	
Ser Tyr Ser Gly Thr Tyr Phe Cys Gly		
	105 110	

VII - INFORMATION POUR SEQ ID N° 6

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

TYPE : nucléotide et sa protéine correspondante

LONGUEUR : 569 paires de bases

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : ADNC pour ARNm

10 ORIGINE

ORGANISME : humain

LIGNEE CELLULAIRE : lymphocytes T humains

CARACTERISTIQUES

NOM DE L'ADN : IGR a 08

15 SEQUENCE Vα 1

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE

TCAGTTTCTT																10
CTTCCTGCAG	CTGCTTGAGT	TCTTTCCAGA	CAAAGACAAG	TGACAAGAAT	TAGAGGTTTA											70
AAAAGCAACC	AGATTCATCT	CAGCAGCTTT	TGTAGTTTTA	AATAAGCAAG	GAGTTTCTCC											130
AGCGAAACTT	CCTCACACCT	CTTGGTCTTG	GTCTCTTCAG	ACACTTTCCT	TCCTGTTCTC											190
TGGAGATCTT	GCAGAAAAGA	GCCTGCAGTG	TTTCCCTTGC	TCAGCC	ATG	CTC	CTG									245
					Met	Leu	Leu									
GAG	CTT	ATC	CCA	CTG	CTG	GGG	ATA	CAT	TTT	GTC	CTG	AGA	ACT	GCC	AGA	293
Glu	Leu	Ile	Pro	Leu	Leu	Gly	Ile	His	Phe	Val	Leu	Arg	Thr	Ala	Arg	
5						10					15					
GCC	CAG	TCA	GTG	ACC	CAG	CCT	GAC	ATC	CAC	ATC	ACT	GTC	TCT	GAA	GGA	341
Ala	Gln	Ser	Val	Thr	Gln	Pro	Asp	Ile	His	Ile	Thr	Val	Ser	Glu	Gly	
20					25					30					35	
GCC	TCA	CTG	GAG	TTG	AGA	TGT	AAC	TAT	TCC	TAT	GGG	GCA	ACA	CCT	TAT	389
Ala	Ser	Leu	Glu	Leu	Arg	Cys	Asn	Tyr	Ser	Tyr	Gly	Ala	Thr	Pro	Tyr	
				40					45					50		
CTC	TTC	TGG	TAT	GTG	CAG	TCC	CCC	GGC	CAA	GGC	CTC	CAG	CTG	CTC	CTG	437
Leu	Phe	Trp	Tyr	Val	Gln	Ser	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Gln	Leu	Leu	Leu	
			55					60					65			
AAG	TAC	TTT	TCA	GGA	GAC	ACT	CTG	GTT	CAA	GGC	ATT	AAA	GGC	TTT	GAG	485
Lys	Tyr	Phe	Ser	Gly	Asp	Thr	Leu	Val	Gln	Gly	Ile	Lys	Gly	Phe	Glu	
		70					75					80				
GCT	GAA	TTT	AAG	AGG	AGT	CAA	TCT	TCC	TTC	AAC	CTG	AGG	AAA	CCC	TCT	533
Ala	Glu	Phe	Lys	Arg	Ser	Gln	Ser	Ser	Phe	Asn	Leu	Arg	Lys	Pro	Ser	
	85					90					95					
GTG	CAT	TGG	AGT	GAT	GCT	GCT	GAG	TAC	TTC	TGT	GCT					569
Val	His	T.p	Ser	Asp	Ala	Ala	Glu	Tyr	Phe	Cys	Ala					
100					105					110						

VIII - INFORMATION POUR SEQ ID N° 7

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

TYPE : nucléotide et sa protéine correspondante

LONGUEUR : 330 paires de bases

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : ADNc pour ARNm

SEQUENCE CONSENSUS

ORIGINE

ORGANISME : humain

LIGNEE CELLULAIRE : lymphocytes T humains

CARACTERISTIQUES

NOM DE L'ADN : IGR a 09

SEQUENCE Vα 2

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE

AAA TCC TTG AGA GTT TTA CTA GTG ATC CTG TGG CTT CAG CTG AGC CGG	48
Lys Ser Leu Arg Val Leu Leu Val Ile Leu Trp Leu Gln Leu Ser Arg	
1 5 10 15	
GTT TGG AGC CAA CAG AAG GAG GTG GAG CAG AAT TCT GGA CCC CTC AGT	96
Val Trp Ser Gln Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser	
20 25 30	
GTT CCA GAG GGA GCC ATT GCC TCT CTC AAC TCC ACT TAC AGT GAC CGA	144
Val Pro Glu Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg	
35 40 45	
GGT TCC CAG TCC TTC TTC TGG TAC AGA CAA TAT TCT GCG AAA AGC CCT	192
Gly Ser Gln Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro	
50 55 60	
GAG TTG ATA ATG TCC ATA TAC TCC AAT GGT GAC AAA GAA GAT GGA AGG	240
Glu Leu Ile Met Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg	
65 70 75 80	
TTT ACA GCA CAG CTC AAT AAA GCC AGC CAG TAT GTT TCT CTG CTC ATC	288
Phe Thr Ala Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile	
85 90 95	
AGA GAC TCC CAG CCC AGT GAT TCA GCC ACC TAC CTC TGT GCC	330
Arg Asp Ser Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala	
100 105 110	

IX - INFORMATION POUR SEQ ID N° 8

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

TYPE : nucléotide et sa protéine correspondante

LONGUEUR : 400 paires de bases

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : ADNC pour ARNm

10 SEQUENCE CONSENSUS

ORIGINE

ORGANISME : humain

LIGNEE CELLULAIRE : lymphocytes T humains

CARACTERISTIQUES

15 NOM DE L'ADN : IGR a 10

SEQUENCE Vα 5

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE

GCCAAACAGA ATGGCTTTTT GGCTGAGAAG GCTGGGTCTA CATTTCAGGC 50

CACATTGCGG GAGACGA ATG GAG TCA TCC CTG GGA GGT GTT TTG 94
Met Glu Ser Ser Leu Gly Gly Val Leu
1 5

CTG ATT TTG TGG CTT CAA GTG GAC TGG GTG AAG AGC CAA AAG ATA GAA 142
Leu Ile Leu Trp Leu Gln Val Asp Trp Val Lys Ser Gln Lys Ile Glu
10 15 20 25

CAG AAT TCC GAG GCC CTG AAC ATT CAG GAG GGT AAA ACG GCC ACC CTG 190
Gln Asn Ser Glu Ala Leu Asn Ile Gln Glu Gly Lys Thr Ala Thr Leu
30 35 40

ACC TGC AAC TAT ACA AAC TAT TCT CCA GCA TAC TTA CAG TGG TAC CGA 238
 Thr Cys Asn Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ala Tyr Leu Gln Trp Tyr Arg
 45 50 55

CAA GAT CCA GGA AGA GGC CCT GTT TTC TTG CTA CTC ATA CGT GAA AAT 286
Gln Asp Pro Gly Arg Gly Pro Val Phe Leu Leu Leu Ile Arg Glu Asn
60 65 70

GAG AAA GAA AAA AGG AAA GAA AGA CTC AAG GTC ACC TTT GAT ACC ACC 334
Glu Lys Glu Lys Arg Lys Glu Arg Leu Lys Val Thr Phe Asp Thr Thr
75 80 85

CTT AAA CAG AGT TTG TTT CAT ATC ACA GCC TCC CAG CCT GCA GAC TCA 182
Leu Lys Gln Ser Leu Phe His Ile Thr Ala Ser Gln Pro Ala Asp Ser
90 95 100 105

GCT ACC TAC CTC TGT GCT
Ala Thr Tyr Leu Cys Ala
110

2079879

X - INFORMATION POUR SEQ ID N° 9

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

TYPE : nucléotide et sa protéine correspondante

LONGUEUR : 386 paires de bases

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : ADNC pour ARNm

10 SEQUENCE CONSENSUS

ORIGINE

ORGANISME : humain

LIGNEE CELLULAIRE : lymphocytes T humains

CARACTERISTIQUES

15 NOM DE L'ADN : IGR a 11

SEQUENCE Vα 7

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE

GCCTTCTGCA GACTCCAATG GCTCAGGAAC TGGGAATGCA GTCCAGGCT 50

CGTGGTATCC TGCAGCAG ATG TGG GGA GTT TTC CTT CTT TAT GTT 95
Met Trp Gly Val Phe Leu Leu Tyr Val
1 5

TCC ATG AAG ATG GGA GGC ACT ACA GGA CAA AAC ATT GAC CAG CCC ACT 143
Ser Met Lys Met Gly Gly Thr Thr Gly Gln Asn Ile Asp Gln Pro Thr
10 15 20 25

GAG ATG ACA GCT ACG GAA GGT GCC ATT GTC CAG ATC AAC TGC ACG TAC 191
Glu Met Thr Ala Thr Glu Gly Ala Ile Val Gln Ile Asn Cys Thr Tyr
10 35 40

CAG ACA TCT GGG TTC AAC GGG CTG TTC TGG TAC CAG CAA CAT GCT GGC 239
Gln Thr Ser Gly Phe Asn Gly Leu Phe Trp Tyr Gln Gln His Ala Gly
45 50 55

GAA GCA CCC ACA TTT CTC TCT TAC AAT GTT CTC GAT GGT TTG GAG GAG 287
Glu Ala Pro Thr Phe Leu Ser Tyr Asn Val Leu Asp Gly Leu Glu Glu
60 65 70

AAA GGT CGT TTT TCT TCA TTC CTT AGT CGG TCT AAA GGG TAC AGT TAC 335
Lys Gly Arg Phe Ser Ser Phe Leu Ser Arg Ser Lys Gly Tyr Ser Tyr
75 80 85

CTC	CTT	TTG	AAG	GAG	CTC	CAG	ATG	AAA	GAC	TCT	GCC	TCT	TAC	CTC	TGT	383
Leu	Leu	Leu	Lys	Glu	Leu	Gln	Met	Lys	Asp	Ser	Ala	Ser	Tyr	Leu	Cys	
90					95					100					105	

GCT
Ala

386

XI - INFORMATION POUR SEQ ID N° 10

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

5 TYPE : nucléotide et sa protéine corres-
pondante

LONGUEUR : 383 paires de bases

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : ADNc pour ARNm

10 ORIGINE

ORGANISME : humain

LIGNEE CELLULAIRE : lymphocytes T humains

CARACTERISTIQUES

NOM DE L'ADN : IGR a 12

15 SEQUENCE Vα 22

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE

TGTGACTTCT TCATGTTAAG GATCAAGACC ATTATTTGGG TAACACACTA 50

AAG ATG AAC TAT TCT CCA GGC TTA GTA TCT CTG ATA CTC TTA CTG 95
Met Asn Tyr Ser Pro Gly Leu Val Ser Leu Ile Leu Leu Leu
1 5 10

CTT GGA AGA ACC CGT GGA GAT TCA GTG ACC CAG ATG GAA GGG CCA GTG 143
Leu Gly Arg Thr Arg Gly Asp Ser Val Thr Gln Met Glu Gly Pro Val
15 20 25 30

ACT CTC TCA GAA GAG GCC TTC CTG ACT ATA AAC TGC ACG TAC ACA GCC 191
Thr Leu Ser Glu Glu Ala Phe Leu Thr Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Ala
35 40 45

ACA GGA TAC CCT TCC CTT TTC TGG TAT GTC CAA TAT CCT GGA GAA GGT 239
Thr Gly Tyr Pro Ser Leu Phe Trp Tyr Val Gln Tyr Pro Gly Glu Gly
50 55 60

CTA CAG CTC CTC CTG AAA GCC ACG AAG GCT GAT GAC AAG GGA AGC AAC 287
Leu Gln Leu Leu Leu Lys Ala Thr Lys Ala Asp Asp Lys Gly Ser Asn
65 70 75

AAA GGT TTT GAA GCC ACA TAC CGT AAA GAA ACC ACT TCT TTC CAC TTG 335
Lys Gly Phe Glu Ala Thr Tyr Arg Lys Glu Thr Thr Ser Phe His Leu
80 85 90

GAG AAA GGC TCA GTT CAA GTG TCA GAC TCA GCG GTG TAC TTC TGT GCT 383
Glu Lys Gly Ser Val Gln Val Ser Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala
95 100 105 110

XII - INFORMATION POUR SEQ ID N° 11

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

5 TYPE : nucléotide et sa protéine corres-
pondante
LONGUEUR : 364 paires de bases
NOMBRE DE BRINS : simple
CONFIGURATION : linéaire
TYPE DE MOLECULE : ADNc pour ARNm

10 ORIGINE

ORGANISME : humain
LIGNEE CELLULAIRE : lymphocytes T humains

CARACTERISTIQUES

15 NOM DE L'ADN : IGR a 13
SEQUENCE Vα 16

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE

AATCCCCCCC	GGCGTCAGCT	TAGCTGGAGC	C	ATG	GCC	TCT	GCA	CCC	46
				Met	Ala	Ser	Ala	Pro	
				1				5	
ATC	TCG	ATG	CTT	GCG	ATG	CTC	TTC	ACA	94
Ile	Ser	Met	Leu	Ala	Met	Leu	Phe	Thr	
			10				15		
CTG	AGA	GCT	CAG						
Leu	Arg	Ala	Gln						
			20						
TCA	GTG	GCT	CAG	CCG	GAA	GAT	CAG	GTC	142
Ser	Val	Ala	Gln	Pro	Glu	Asp	Gln	Val	
			25				30		
GTT	GCT	GAA	GGG	AAT	CCT				
Val	Ala	Glu	Gly	Asn	Pro				
			35						
CTG	ACT	GTG	AAA	TGC	ACC	TAT	TCA	GTC	190
Leu	Thr	Val	Lys	Cys	Thr	Tyr	Ser	Val	
		40				45			
TCT	GGA	AAC	CCT	TAT	CTT	TTT			
Ser	Gly	Asn	Pro	Tyr	Leu	Phe			
			50						
TGG	TAT	GTT	CAA	TAC	CCC	AAC	CGA	GGC	238
Trp	Tyr	Val	Gln	Tyr	Pro	Asn	Arg	Gly	
	55				60			65	
CTC	CAG	TTC	CTT	CTG	AAA	TAC			
Leu	Gln	Phe	Leu	Leu	Lys	Tyr			
ATC	ACA	GGG	GAT	AAC	CTG	GTT	AAA	GGC	286
Ile	Thr	Gly	Asp	Asn	Leu	Val	Lys	Gly	
				75				80	
TAT	GCC	TTT	GAA	GCT	GAA				
Tyr	Gly	Phe	Glu	Ala	Glu				
					85				
TTT	AAC	AAG	AGC	CAA	ACC	TCC	TTC	CAC	334
Phe	Asn	Lys	Ser	Gln	Thr	Ser	Phe	His	
				90			95		
CTC	AAG	AAA	CCA	TCT	GCC	CTT			
Leu	Lys	Lys	Pro	Ser	Ala	Leu			
GTG	AGC	GAC	TCC	GCT	TTG	TAC	TTC	TGT	364
Val	Ser	Asp	Ser	Ala	Leu	Tyr	Phe	Cys	
			105					110	

XIII - INFORMATION POUR SEQ ID N° 12

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

TYPE : nucléotide et sa protéine corres-
pondante

LONGUEUR : 264 paires de bases

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : ADNc pour ARNm

10 ORIGINE

ORGANISME : humain

LIGNEE CELLULAIRE : lymphocytes T humains

CARACTERISTIQUES

NOM DE L'ADN : Ja 01

15 SEQUENCE J α

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE

CCTTCAAGGA AAATTAAGGC AAATAGAATT GGGCTGGGGA GTTGCTACTT ATTAGTATTC 60

CTCCCACGTT CTAACCTAAT TATAAGGAGG TTGTTTGGC CATGGGCAGT CATCTCAGGT 120

TTTGTTTTCC TGCTTTCCTC CCTAACCTCC ACCTGTCTTC CTAGAGGCCT GAGTCAAGGT 180

TATTGCAATA GCACTAAAGA CTGTGT AAC ACC AAT GCA GGC AAA TCA ACC TTT 233
Asn Thr Asn Ala Gly Lys Ser Thr Phe
1 5

GGG GAT GGG ACT ACG CTC ACT GTG AAG CCA 264
Gly Asp Gly Thr Thr Leu Thr Val Lys Pro
10 15

XIV - INFORMATION POUR SEQ ID N° 13

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

TYPE : nucléotide et sa protéine corres-
pondante

5

LONGUEUR : 277 paires de bases

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : ADNc pour ARNm

10

ORIGINE

ORGANISME : humain

LIGNEE CELLULAIRE : lymphocytes T humains

CARACTERISTIQUES

NOM DE L'ADN : Ja 02

15

SEQUENCE J α

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE

AAGGACACAG ACTGCCTGCA TGAAGGCTGG AGCTGGGCCC AGGATGAGGA AAGGCCTCAG 60

GAAGGAAGGG CTGACACGAA ATAAGGAATA CCATGGCATT CATGAGATGT GCCTCTGAAT 120

CCTCTCTCTT GCCTGAGAAG CTTTAGCTTC CACCTTGAGA CACAAAACAT GTGGTTATGA 180

AGAGATGACA AGGTTTTTGT AAAAGAATGA GCCATTGTGG ATA GGC TTT GGC AAT 234
Ile Gly Phe Gly Asn
1 5GTG CTG CAT TGC GGG TCC GGC ACT CAA GTG ATT GTT TTA CCA 277
Val Leu His Cys Gly Ser Gly Thr Gln Val Ile Val Leu Pro
10 15

XVI - INFORMATION POUR SEQ ID N° 15

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

5 TYPE : nucléotide et sa protéine corres-
pondante

LONGUEUR : 60 paires de bases

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : ADNc pour ARNm

10 ORIGINE

ORGANISME : humain

LIGNEE CELLULAIRE : lymphocytes T humains

CARACTERISTIQUES

NOM DE L'ADN : Ja 04

15 SEQUENCE Jα

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE

TA	GAT	ACT	GGA	GCC	TTC	AAA	ACT	ATC	TTT	GGA	GCA	GGA	ACA	AGA	CTA	47
	Asp	Thr	Gly	Gly	Phe	Lys	Thr	Ile	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Arg	Leu	
1					5				10						15	
																60
TTT	GTT	AAA	GCA	A												
Phe	Val	Lys	Ala													

XVII - INFORMATION POUR SEQ ID N° 16

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

5

LONGUEUR : 59 paires de bases

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : ADNc pour ARNm

10 ORIGINE

ORGANISME : humain

LIGNEE CELLULAIRE : lymphocytes T humains

CARACTERISTIQUES

NOM DE L'ADN : Ja 05

15 SEQUENCE J α

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE

[illegible]

XVIII - INFORMATION POUR SEQ ID N° 17

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

TYPE : nucléotide et sa protéine correspondante

LONGUEUR : 60 paires de bases

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : ADNc pour ARNm

10 ORIGINE

ORGANISME : humain

LIGNEE CELLULAIRE : lymphocytes T humains

CARACTERISTIQUES

NOM DE L'ADN : Ja 06

15 SEQUENCE J α

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE

AT GGA GGA AGC CAA GGA AAT CTC ATC TTT GGA AAA GGC ACT AAA CTC 47
Gly Gly Ser Gln Gly Asn Leu Ile Phe Gly Lys Gly Thr Lys Leu
1 5 10 15

TCT GTT AAA CCA A
Ser Val Lys Pro

XX - INFORMATION POUR SEQ ID N° 19

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

5 TYPE : nucléotide et sa protéine corres-
pondante

LONGUEUR : 57 paires de bases

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : ADNc pour ARNm

10 ORIGINE

ORGANISME : humain

LIGNEE CELLULAIRE : lymphocytes T humains

CARACTERISTIQUES

NOM DE L'ADN : Ja 08

15 SEQUENCE Jα

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE

CT	GGT	GGC	TAC	AAT	AAG	CTG	ATT	TTT	GCA	GCA	GGG	ACC	AGG	CTG	GCT	47
	Gly	Gly	Tyr	Asn	Lys	Leu	Ile	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Arg	Leu	Ala	
	1				5				10					15		

GTA	CAC	CCA	T	57
Val	His	Pro		

XXI - INFORMATION POUR SEQ ID N° 20

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

5 TYPE : nucléotide et sa protéine correspondante

LONGUEUR : 50 paires de bases

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULES : ADNC pour ARNm

10 ORIGINE

ORGANISME : humain

LIGNEE CELLULAIRE : lymphocytes T humains

CARACTERISTIQUES

NOM DE L'ADN : Ja 09

15 SEQUENCE J α

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE

[illegible]

XXII - INFORMATION POUR SEQ ID N° 21 à 25

TYPE OLIGONUCLEOTIDES

5

DESCRIPTION DES SEQUENCES

N° 21 A (5'-GTTGCTCCAGGCCACAGCACTG)

10

N° 22 poly C (5'-GCATGCGCGCGGCCGCGGAGG-14C)

N° 23 B (5'-GTCCATAGACCTCATGTCCAGCACAG)

N° 24 C (5'-ATACACATCAGAATTCTTACTTTG)

15

N° 25 D (5'-GTCACTGGATTTAGAGTCT)

XXIII - INFORMATION POUR SEQ ID N° 26 à 63
 TYPE OLIGONUCLEOTIDES
 DESCRIPTION DES SEQUENCES

SEQ ID N°	Sequence	Type	Clone	Position
26	5'-GGCATTAACGGTTTTGAGGCTGGA-3'	V α 1	AB22	235
27	5'-CAGTGTTCCAGAGGGAGCCATTGC-3'	V α 2	IGRa09	93*
28	5'-CCGGGCAGCAGACACTGCTTCTTA-3'	V α 3	HAP05	297
29	5'-TTGGTATCGACAGCTTCCCTCCCA-3'	V α 4	HAP08	153
30	5'-CGGCCACCCTGACCTGCAACTATA-3'	V α 5	IGRa10	113
31	5'-TCCGCCAACCTTGTCATCTCCGCT-3'	V α 6	HAP01	287
32	5'-GCAACATGCTGGCGGAGCACCAC-3'	V α 7	IGRa11	159
33	5'-CATTCGTTCAAATGTGGGCAAAG-3'	V α 8	HAP41	204
34	5'-CCAGTACTCCAGACAACGCCTGCA-3'	V α 9	HAVP36	168
35	5'-CACTGCGGGCCAGCCTGGTGATAC-3'	V α 10	HAP58	282
36	5'-CGCTGCTCATCCTCCAGGTGCGGG-3'	V α 11	AB19	254*
37	5'-TCGTCGGAACCTCTTTTGATGAGCA-3'	V α 12	V12MA483	213
38	5'-TTCATCAAAACCCTTGGGGACAGC-3'	V α 13	HAVT15	152*
39	5'-CCCAGCAGGCAGATGATTCTCGTT-3'	V α 14	HAVT20	181
40	5'-TTGCAGACACCAGACTGGGGACT-3'	V α 15	HAVT31	278
41	5'-TCAACGTTGCTGAAGGGAATCCTC-3'	V α 16	IGRa13	89
42	5'-TGGGAAAGGCCGTGCATTATTGAT-3'	V α 17	AB11	204
43	5'-CAGCACCAATTTACCTGCAGCTT-3'	V α 18	AB21	114
44	5'-ACACTGGCTGCAACAGCATCCAGG-3'	V α 19	AC24	162
45	5'-TCCCTGTTTATCCCTGCCGACAGA-3'	V α 20	AE212	232
46	5'-AGCAAAATTCACCATCCCTGAGCG-3'	V α 21	AF211	92
47	5'-CCTGAAAGCCACGAAGGCTGATGA-3'	V α 22	IGRa12	197
48	5'-TGCCTCGCTGGATAAATCATCAGG-3'	V α w23	IGRa01	246
49	5'-CTGGATGCAGACACAAAGCAGAGC-3'	V α w24	IGRa02	259
50	5'-TGGCTACGGTACAAAGCCGGACCCT-3'	V α w25	IGRa03	148
51	5'-AGCCAGCCATGCAGGCATGTACC-3'	V α w26	IGRa04	299
52	5'-AAGCCCGTCTCAGCACCCCTCCACA-3'	V α w27	IGRa05	268*
53	5'-TGGTTGTGCACGAGCGAGACACTG-3'	V α w28	IGRa06	95
54	5'-GAAGGGTGGAGAACAGATGCGTCG-3'	V α w29	IGRa07	210
55	5'-ATACACATCAGAATTCTTACTTTG-3'	C α A		129

SEQ ID N°	Sequence	Type	Clone	Position
56	5'-GTTGCTCCAGGCCGCGGCACTGTT-3'	C α B		201
57	5'-GTCACTGGATTTAGAGTCT-3'	C α C		57
58	5'-ATTTGCGGTGGACGATGGAGGGGC-3'	Act 1	β -actine	1161
59	5'-GGCATCGTCACCAACTGGGACGAC-3'	Act 2	β -actine	261
60	5'-ACCACCACGGCGGAGCGGG-3'	Act 3	β -actine	642
61	5'-CGGGCTGCTCCTTGAGGGGCTGCG-3'	C β F		135
62	5'-CCCACCCGAGGTCGCTGTG-3'	C β K		20
63	5'-TCTGCTTCTGATGGCTCAA-3'	C β C		58

REVENDICATIONS

1. Séquence nucléotidique codant pour une région variable de chaînes α des récepteurs des lymphocytes T humains, correspondant à un ADNc comprenant une séquence nucléotidique choisie parmi l'un quelconque:
 - a - des segments V α correspondant à l'une des séquences SEQ ID N° 1 à 11, et
 - 10 b - des segments J α correspondant à l'une des séquences SEQ ID N° 12, 13 et 15 à 20,ou une séquence qui en diffère par jusqu'à 8 nucléotides.
2. Séquence nucléotidique selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle diffère de ladite séquence par jusqu'à 1 ou 2 nucléotides.
3. Séquence nucléotidique selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle diffère de ladite séquence par la
20 délétion ou l'addition de jusqu'à 1 ou 2 codons.
4. Séquence selon la revendication 1, codant pour une région variable des chaînes α des récepteurs des lymphocytes T humains, correspondant à un ADNc comprenant une séquence nucléotidique choisie parmi l'un quelconque des segments V α correspondant à l'une des séquences SEQ ID N° 1 à 10, ou une séquence qui en diffère par jusqu'à 8 nucléotides.
5. Séquence nucléotidique selon la revendication 4,
30 caractérisée en ce qu'elle diffère de ladite séquence par jusqu'à 1 ou 2 nucléotides.

6. Séquence nucléotidique selon la revendication 4, caractérisée en ce qu'elle diffère de ladite séquence par la délétion ou l'addition de jusqu'à 1 ou 2 codons.

7. Séquence selon la revendication 1, codant pour une région variable des chaînes α des récepteurs des lymphocytes T humains, correspondant à un ADNc comprenant une séquence nucléotidique choisie parmi l'un quelconque des segments J α correspondant à l'une des séquences SEQ ID N° 12, 13 et 15 à 20, ou une séquence qui en diffère par jusqu'à 8 nucléotides.

8. Séquence nucléotidique selon la revendication 7, caractérisée en ce qu'elle diffère de ladite séquence par jusqu'à 1 ou 2 nucléotides.

9. Séquence nucléotidique selon la revendication 7, caractérisée en ce qu'elle diffère de ladite séquence par la délétion ou l'addition de jusqu'à 1 ou 2 codons.

20

10. Séquence nucléotidique codant pour une région variable de chaînes α des récepteurs des lymphocytes T humains correspondant à un ADNc correspondant à tout ou partie d'une séquence nucléotidique choisie parmi l'un quelconque des segments V α correspondant à l'une des séquences SEQ ID N° 2 à 5, ou une séquence qui en diffère par un ou deux nucléotides.

30

11. Séquence nucléotidique codant pour une région variable de chaînes α des récepteurs des lymphocytes T humains correspondant à un ADNc correspondant à tout ou partie d'une séquence nucléotidique choisie parmi l'un quelconque des segments V α correspondant à l'une des séquences

50

1 à 200 de SEQ ID N° 1;
 1 à 467 de SEQ ID N° 6;
 1 à 77 de SEQ ID N° 7;
 1 à 151 de SEQ ID N° 8;
 291 à 386 de SEQ ID N° 9; et
 1 à 260 de SEQ ID N° 10;

ou une séquence qui en diffère par un ou deux nucléotides.

10 12. Séquence nucléotidique codant pour une région variable de chaînes α des récepteurs des lymphocytes T humains correspondant à un ADNc correspondant à tout ou partie de la séquence nucléotidique correspondant à la SEQ ID N° 11, et qui comprend le nucléotide 108.

20 13. Séquence nucléotidique codant pour une région variable de chaînes α des récepteurs des lymphocytes T humains correspondant à un ADNc correspondant à tout ou partie d'une séquence nucléotidique choisie parmi l'un quelconque des segments J α correspondant à l'une des séquences SEQ ID N° 12, 13 et 15 à 20 ou une séquence qui en diffère par un ou deux nucléotides.

14. Peptide codé par l'une quelconque des séquences nucléotidiques telle que définie à l'une quelconque des revendications 1 à 13, ainsi que les allèles de ceux-ci qui possèdent la même fonction.

15. Peptide comprenant une séquence peptidique codée par la séquence 108 à 364 de SEQ ID N° 11.

30

16. Vecteur d'expression comprenant une séquence d'ADN codant pour le peptide tel que défini à la revendication 14 ou à la revendication 15.

17. Hôte cellulaire transformé avec un vecteur selon la revendication 16.
18. Anticorps dirigé contre un déterminant antigénique du peptide tel que défini à la revendication 14 ou à la revendication 15.
19. Composition de diagnostic comprenant un ou plusieurs anticorps tel que défini à la revendication 18 et un milieu physiologiquement acceptable.
20. Composition thérapeutique comprenant un ou plusieurs anticorps tel que défini à la revendication 18 et un milieu physiologiquement acceptable.
21. Composition selon la revendication 20, comprenant une molécule cytotoxique ou un radioisotope et un milieu physiologiquement acceptable.
22. Composition thérapeutique comprenant au moins l'un des peptides tel que défini à la revendication 14 ou à la revendication 15 et un milieu physiologiquement acceptable.
23. Composition thérapeutique comprenant des oligonucléotides antisens correspondant à l'une quelconque des séquences d'un segment V α ou à l'une quelconque des séquences d'un segment J α telle que définie à l'une quelconque des revendications 10 à 13 et un milieu physiologiquement acceptable.
24. Utilisation, en tant qu'amorces pour l'amplification d'ADN correspondant à des régions variables de chaînes α des récepteurs de cellules T, choisis parmi les séquences SEQ ID N° 26 à 54, de séquences nucléotidiques d'au moins 17

nucléotides comprises dans l'une quelconque des séquences d'un segment V α ou dans l'une quelconque des séquences d'un segment J α telles que définies à l'une quelconque des revendications 10 à 13.

25. Utilisation, en tant que sonde de détection d'une région variable de chaîne α , d'une séquence nucléotidique d'au moins 10 nucléotides comprise dans l'une quelconque des séquences d'un segment V α ou dans l'une quelconque des séquences d'un segment J α telle que définie à l'une quelconque des revendications 10 à 13.

26. Oligonucléotide, utilisé comme amorce pour l'amplification d'ADN correspondant à une région variable de chaînes α des récepteurs de cellules T, choisi parmi les séquences SEQ ID N° 26 à 54.

27. Utilisation, comme amorce pour l'amplification d'ADN correspondant à une région variable de chaînes α des récepteurs de cellules T, d'un oligonucléotide selon la revendication 26.

28. Utilisation selon la revendication 27 où l'oligonucléotide choisi parmi les séquences SEQ ID N° 49, 50, 51, 52 et 54.

29. Procédé de détection de séquences nucléotidiques codant pour des segments V α des récepteurs T ou d'ADNc correspondant aux produits de transcription de celles-ci, dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend:

- a) l'amplification de l'ADN avec au moins une paire d'amorces formée par l'un des oligonucléotides selon la revendication 26 et un oligonucléotide appartenant au segment C α , et
- b) la détection des séquences amplifiées avec une sonde C α .

53

30. Procédé selon la revendication 29, caractérisé en ce que l'on effectue l'amplification en présence d'une paire d'amorces contrôle et la détection à l'aide d'une sonde contrôle.

31. Kit de diagnostic pour la mise en oeuvre d'un procédé selon la revendication 29, caractérisé en ce qu'il comprend:

a) au moins un oligonucléotide selon la revendication 26,

10 b) une amorce C α , et

c) une sonde C α .

32. Kit de diagnostic pour la mise en oeuvre d'un procédé selon la revendication 30, caractérisé en ce qu'il comprend:

a) au moins un oligonucléotide selon la revendication 26,

b) une amorce C α ,

c) une paire d'amorce contrôle,

d) une sonde C α , et

20 e) une sonde contrôle.

33. Kit selon la revendication 31 ou la revendication 32 comprenant:

a) l'ensemble des 29 oligonucléotides selon la revendication 26,

b) une amorce C α choisie parmi les séquences correspondant aux séquences SEQ ID N° 55 et 56,

c) une paire d'amorces contrôle pour la β -actine ayant une séquence correspondant respectivement aux séquences SEQ
30 ID N° 58 et 59,

d) une sonde C α correspondant à la séquence SEQ ID N° 57, et

e) une sonde contrôle pour la β -actine correspondant à la séquence SEQ ID N° 60.

V α 1

IGRa08 AGTGTTTCCCTTGCTCAGCCAT¹GCTCCTGGAGCTTATCCCCTGCTGGGGATAC
 IGRa08 ATTTTGTCTGAGAACTGCCAGAGCCCAGTCAGTGACCCAGCCTGACATCCACA
 IGRa08 TCACTGTCTCTGAAGGAGCCTCACTGGAGTTGAGATGTAACCTATTCCTATGGGG
 IGRa08 CAACACCTTATCTCTTCTGGTATGTCCAGTCCCCGGCCAAGGCCTCCAGCTGC
 IGRa08 TCCTGAAGTACTTTTCAGGAGACACTCTGGTTCAAGGCATTAAAGGCTTTGAGG
 AE11
 IGRa08 CTGAATTTAAGAGGAGTCAATCTTCCTTCAACCTGAGGAAACCCTCTGTGCATT
 AE11 T.....
 IGRa08 GGAGTGATGCTGCTGAGTACTTCTGTGCT 333
 AE11 102

FIG. 1A

V α 2

IGRa09 AAATCCTTGAGAGTTTTACTAGTGATCCTGTGGC
 IGRa09 TTCAGCTGAGCCGGGTTTGGAGCCAACAGAAGGAGGTGGAGCAGAATTCTGGAC
 AF110
 IGRa09 CCCTCAGTGTTCCAGAGGGAGCCATTGCCTCTCTCAACTGCACTTACAGTGACC
 AF110
 IGRa09 GAGGTTCCCAGTCCTTCTTCTGGTACAGACAATATTCTGGGAAAAGCCCTGAGT
 AF110
 IGRa09 TGATAATGTCCATATACTCCAATGGTGACAAAGAAGATGGAAGGTTTACAGCAC
 AF110
 IGRa09 AGCTCAATAAAGCCAGCCAGTATGTTTCTCTGCTCATCAGAGACTCCCAGCCCA
 AF110
 IGRa09 GTGATTCAGCCACCTACCTCTGTGCC 330
 AF110 252

FIG. 1B

Va5

1

IGRa10 GGCCACATTTGGGGAGACGAATGGAGTCATCCCTGGGAGGTGTTTTGCTGATTT
HAP35

IGRa10 TGTGGCTTCAAGTGGACTGGGTGAAGAGCCAAAAGATAGAACAGAATTCCGAGG
HAP35

IGRa10 CCCTGAACATTCAGGAGGGTAAAACGGCCACCCTGACCTGCAACTATACAACT
HAP35

IGRa10 ATTCTCCAGCATACTTACAGTGGTACCGACAAGATCCAGGAAGAGGCCCTGTTT
HAP35

IGRa10 TCTTGCTACTCATACGTGAAAATGAGAAAGAAAAAAGGAAAGAAAGACTGAAGG
HAP35

IGRa10 TCACCTTTGATACCACCCTTAAACAGAGTTTGTTTCATATCACAGCCTCCCAGC
HAP35

IGRa10 CTGCAGACTCAGCTACCTACCTCTGTGCT 333
HAP35 249

FIG. 1C

Va7

1

IGRa11 CTCGTGGTATCCTGCAG-
CAGATGTGGGGAGTTTTCTTCTTTATGTTTCCATGA
HAP12

IGRa11 AGATGGGAGGCACTACAGGACAAAACATTGACCAGCCCACTGAGATGACAGCTA
HAP12

IGRa11 CGGAAGGTGCCATTGTCCAGATCAACTGCACGTACCAGACATCTGGGTTCACG
HAP12

IGRa11 GGCTGTTCTGGTACCAGCAACATGCTGGCGAAGCACCCACATTTCTGTCTTACA
HAP12

IGRa11 ATGTTCTGGATGGTTTGGAGGAGAAAGGTCGTTTTTCTTCATTCCTTAGTCGGT
HAP12

IGRa11 CTAAAGGGTACAGTTACCTCCTTTTGAAGGAGCTCCAGATGAAAGACTCTGCCT
HAP12

IGRa11 CTTACCTCTGTGCT 318
HAP12 222

FIG. 1D

FEUILLE DE REMPLACEMENT

1
IGRa12 ATTTGGGTAACACACTAAAGATGAAGTATTCTCCAGGCTTAGTATCTCTGATAC
IGRa12 TCTTACTGCTTGGAAGAACCCGTGGAGATTGAGTGACCCAGATGGAAGGGCCAG
IGRa12 TGACTCTCTCAGAAGAGGCCTTCCTGACTATAAACTGCACGTACACAGCCACAG
IGRa12 GATACCCTTCCCTTTTCTGGTATGTCCAATATCCTGGAGAAGGTCTACAGCTCC
IGRa12 TCCTGAAAGCCACGAAGGCTGATGACAAGGGAAGCAACAAAGGTTTTGAAGCCA
AC9
IGRa12 CATACCGTAAAGAAACCACTTCTTTCCACTTGGAGAAAGGCTCAGTTCAAGTGT
AC9
IGRa12 CAGACTCAGCGGTGTACTTCTGTGCT 330
AC9 113

FIG. 1E

F G G T

IGRJa01G GGTTATIGCAATAGCACTAAGACTIGTGTAACACCAATGCAGGCAATCAACCTTTGGGGATGGGACTACGCTCACTIGTGAAGCCA
IGRJa02G GGTTTTTIGTAAAGAATGAGCCATTIGTGGATAGGCTTTGGGAATGTGCTGCATTGCGGGTCCGGCACTCAAGTGATTGTTTTACCA

IGRJa04

TAGATACTGGAGGCTTCAAAATACTATCTTTGGAGCAGGAACAAGACTATTGTTAAAGCA

IGRJa05

CCTAACTGGGGCAACAACGCTCTTCTTTGGGACTGGAACGAGACTCACCGTTCCTCCC

IGRJa06

ATGGAGGAAGCCAAGGAATCTCATCTTTGGAAAAGGCACATAAATCTCTGTTAAACCA

IGRJa07

GGAGCCAATAGTAAGCTGACATTTGGAAAAGGAATAACTCTGAGTGTTAGACCA

IGRJa08

CTGGTGGCTACAATAAGCTGATTTTTTGGAGCAGGGACCAGGCTGGCTGTACACCCA

IGRJa09

TGGAAACAAGCTGGTCTTTGGCGCAGGAACCATTCGTGAGAGTCAAGTCC

4/6

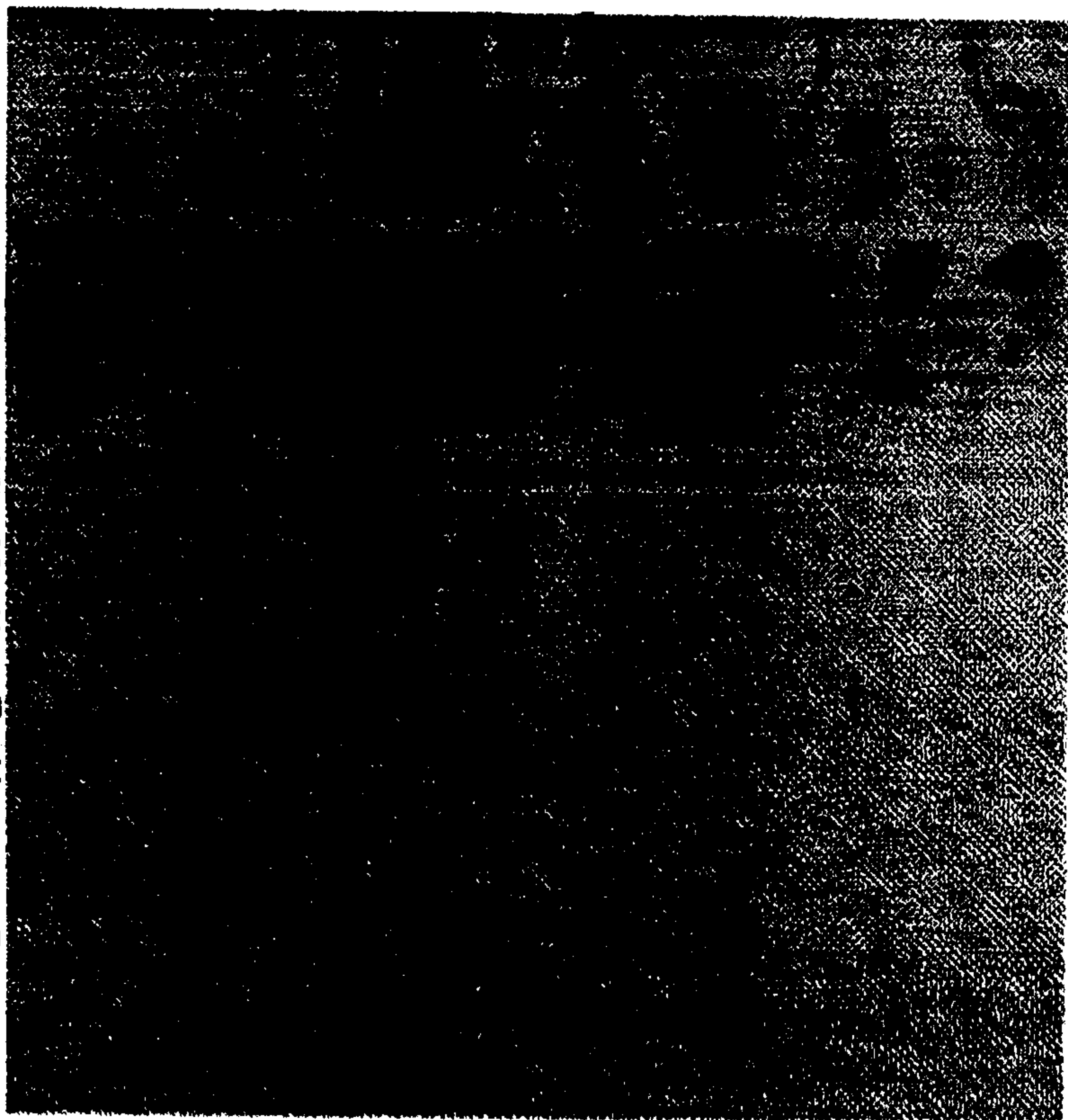
FEUILLE DE REMPLACEMENT

FIG. 2

5/6

SEQ ID N°1_SEQ ID N°2_SEQ ID N°3_SEQ ID N°4_SEQ ID N°5.

R H B R H B R H B R H B R H B R H B

FIG.3

FEUILLE DE REMPLACEMENT

