



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12Q 1/68	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/20794 (43) Date de publication internationale: 29 avril 1999 (29.04.99)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/02244 (22) Date de dépôt international: 20 octobre 1998 (20.10.98) (30) Données relatives à la priorité: 97/13115 20 octobre 1997 (20.10.97) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cedex 13 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): VIVIER, Eric [FR/FR]; 23, boulevard Jean Jaurès, F-13260 Cassis (FR). VELY, Frédéric [FR/FR]; Résidence du Vallat, La Farendole, F-13260 Cassis (FR). (74) Mandataires: PEAUCELLE, Chantal etc.; Cabinet Armengaud Ainé, 3, avenue Bugeaud, F-75116 Paris (FR).		(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
(54) Title: DOCUMENTATION MEANS FOR REPERTOIRES OF NKR IMMUNORECEPTORS AND/OR ACTIVATORY OR NON-INHIBITORY IMMUNORECEPTOR COUNTERPARTS OF NKR IMMUNORECEPTORS (54) Titre: MOYENS DE DOCUMENTATION DE REPERTOIRES EN IMMUNORECEPTEURS NKR ET/OU EN IMMUNORECEPTEURS CONTREPARTIES ACTIVATRICES OU NON INHIBITRICES D'IMMUNORECEPTEURS NKR (57) Abstract The invention concerns an <i>in vitro</i> method for documenting a repertoire in NKR immunoreceptors and/or NKR counterparts, consisting in (i) using at least a pair of oligonucleotides 3' and 5' capable of being hybridised with a target NKR receptor, or NKR counterpart, and not capable of being hybridised with a functional counterpart of said target receptor; (ii) contacting said pair of oligonucleotides 3' and 5' with the DNA or DNAC of a sample under study; and (iii) detecting the ultimately formed hybrids. The invention also concerns the biological applications of said method, in particular for screening banks of organs, tissues and cells for transplant, and kits for its implementation. (57) Abrégé L'invention concerne une méthode <i>in vitro</i> de documentation d'un répertoire en immunorécepteur(s) NKR et/ou contreparties de NKR, comprenant (i) l'utilisation d'au moins une paire d'oligonucléotides 3' et 5' capable de s'hybrider à un récepteur cible NKR, ou contrepartie de NKR, et de ne pas s'hybrider à un récepteur contrepartie fonctionnelle de ce récepteur cible; (ii) la mise en contact de cette paire d'oligonucléotides 3' et 5' avec l'ADN ou ADNc d'un échantillon à étudier; et (iii) la détection des hybrides éventuellement formés. L'invention vise également les applications biologiques de cette méthode, notamment criblage de banque d'organes, tissus, cellules en vue de greffes, et à des kits pour sa mise en oeuvre.		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

**Moyens de documentation de répertoires
en immunorécepteurs NKR et/ou en immunorécepteurs contreparties
activatrices ou non inhibitrices d'immunorécepteurs NKR**

La présente invention concerne des moyens permettant de documenter les répertoires d'un individu humain ou animal en immunorécepteurs NKR (*Natural Killer Receptor*) du type des immunoglobulines ou du type des lectines, et en immunorécepteurs contreparties activatrices, ou à tout le moins non inhibitrices, d'immunorécepteurs NKR. Elle vise également leurs applications biologiques.

Les fonctions immunitaires d'un homme ou d'un animal sont définies par plusieurs catégories de molécules hautement diversifiées, telles que notamment le système des groupes sanguins ABO, la famille des molécules du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité, appelé chez l'homme, système HLA – *Human Leukocyte Antigen*-), la famille des récepteurs pour l'antigène des lymphocytes T (TCR) et des lymphocytes B (BCR). L'ensemble des molécules qu'un individu adulte exprime, ou est capable d'exprimer, pour chacune de ces différentes familles constitue, exception faite des vrais jumeaux, un répertoire évolutif qui lui est propre et qui intervient dans la reconnaissance du soi ou du non-soi.

D'autres grands répertoires ont été plus récemment identifiés. Il s'agit du répertoire en récepteurs NKR de type immunoglobuline et du répertoire en récepteurs NKR de type lectine. Les récepteurs NKR de type immunoglobuline comprennent les récepteurs KIR (*Killer cell Inhibitory Receptor*) tels que notamment les récepteurs p58.1, p58.2, p70.INH, p140.INH. Les récepteurs NKR de type lectine comprennent les récepteurs inhibiteurs NKG2 tels que notamment les récepteurs NKG2A et NKG2B. L'ensemble de ces récepteurs

NKR sont à fonction inhibitrice. Des récepteurs qui leur sont hautement homologues, en particulier au niveau extracytoplasmique, assurent toutefois des fonctions activatrices, ou à tout le moins non inhibitrices : il s'agit des récepteurs KAR (*Killer cell Activatory Receptor*) homologues aux récepteurs KIR, et des récepteurs NKG2C, NKG2D, NKG2E et NKG2F homologues aux récepteurs NKG2A et NKG2B. Les récepteurs contreparties activatrices, ou à tout le moins non inhibitrices, de récepteurs inhibiteurs NKR sont ci-après désignés, par souci de fluidité, contreparties de NKR.

Les récepteurs NKR et les récepteurs contreparties de NKR sont naturellement exprimés par les cellules NK et par des sous-populations de cellules T. Plusieurs de ces récepteurs peuvent être exprimés par une même cellule. Tous ces récepteurs, qu'ils soient inhibiteurs (*i.e.* NKR) ou qu'ils soient activateurs ou non inhibiteurs (*i.e.* contreparties de NKR), ont en commun d'avoir pour ligand des molécules qui ne sont pas dérivées d'antigène : les ligands des récepteurs NKR et des récepteurs contreparties de NKR sont des molécules du CMH de classe I.

La reconnaissance de son ligand par un récepteur NKR déclenche la transduction à la cellule d'un message visant à inhiber son activité, *e.g.* diminution ou arrêt de la cytolyse, de la sécrétion de cytokines, alors que la reconnaissance de son ligand par un récepteur contrepartie de NKR y induit un message activateur, ou à tout le moins non inhibiteur. A la résultante entre récepteurs NKR et récepteurs contreparties de NKR ainsi activés par leurs ligands, correspond un signal, globalement négatif ou positif, d'activation des cellules NK et/ou T qui les expriment.

Les récepteurs NKR et leurs contreparties participent ainsi au contrôle, positif ou négatif, des réactions allogéniques d'un système immunitaire donné vis-à-vis de ce qu'il considère alors comme non-soi par exemple, des cellules cancéreuses ou infectées, ou bien encore des cellules de greffe ou transplantation

allo- ou xéno-génique.

Les récepteurs NKR et leurs contreparties participent en effet aux réactions entre hôte et greffon lors d'une greffe (ou transplantation) de cellules, tissu ou organe qui présente(nt) un certain degré d'incompatibilité antigénique avec l'hôte. L'implication de récepteurs NKR et de leurs contreparties dans la tolérance envers des greffes incompatibles, et dans l'effet sélectif de lyse de cellules malignes parfois observé après greffe de moelle osseuse, ou effet GVL (*Graft Versus Leukemia*), a en effet été démontrée *in vivo* (cf. Cambiaggi *et al.* 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 94, p. 8088-8092 ; Albi *et al.* 1996, Blood, vol. 87, n°9, p. 3993-4000).

Or, les moyens pouvant actuellement être mis en oeuvre dans un contexte médical ne permettent pas de documenter l'ensemble des répertoires d'un patient, d'un organe, d'un tissu ou de cellules.

C'est ainsi qu'actuellement, seule la compatibilité des molécules HLA-A, HLA-B et HLA-DR du donneur et du receveur est vérifiée préalablement à une greffe ou transplantation allo- ou xéno-génique. Ces critères de compatibilité n'apparaissent toutefois pas comme suffisants. Des traitements immunosuppresseurs (par exemple, à base de cyclosporine) doivent compléter ces procédures de greffe ou transplantation de manière à inhiber le système immunitaire du patient. De tels traitements sont à hauts risques pour le patient qui est alors susceptible de développer des infections opportunistes. Ces traitements immunosuppresseurs doivent de plus être maintenus à un certain niveau pendant plusieurs années, et le patient doit alors résister aux effets délétères des médicaments. Finalement, la réussite de telles procédures de greffe ou transplantation reste incertaine. En effet, des rejets de greffe de la part du receveur, ou bien encore, dans le cas de greffes comprenant des cellules immuno-compétentes, des réactions du greffon contre l'hôte (effet GVH, *Graft Versus Host*) sont malgré tout observés. De telles réactions de rejet ou de GVH conduisent généralement à de très sévères lésions;

actuellement, elles ne peuvent toutefois être totalement écartées, et donc prévenues.

Des effets bénéfiques inattendus de greffes allogéniques ont par ailleurs parfois été observés : des greffes allogéniques de moelle osseuse sur des patients leucémiques aplasiques ont parfois conduit à un effet thérapeutique anti-tumoral par lyse des cellules malignes du receveur et préservation de ses cellules saines. Cet effet thérapeutique sélectif, dans lequel sont impliquées les cellules NK et T, est désigné par GVL (*Graft Versus Leukemia*). Potentiellement, une greffe (ou une transplantation) de tissu hématopoïétique en général, et de moelle osseuse en particulier, peut conduire à un effet thérapeutique dans le cadre de malignités hématologiques telles qu'une leucémie, par lyse sélective de celles des cellules du receveur qui ne présentent plus les antigènes d'histocompatibilité présentés par les cellules saines. Les moyens actuellement disponibles pour le milieu médical ne permettent toutefois pas de prédire si l'organe ou le tissu considéré exercera un effet sélectif GVL pour le receveur considéré. Bien que connu, l'effet sélectif GVL ne peut donc actuellement être mis à profit dans le cadre d'une thérapie anticancéreuse.

Les moyens actuellement développés dans le cadre de recherches expérimentales afin de documenter les différents répertoires de cellules humaines ou animales ne permettent par ailleurs pas de documenter précisément le répertoire en récepteurs NKR et en récepteurs contreparties de NKR : l'identité précise de chaque récepteur NKR ou contrepartie de NKR ne peut être déterminée. Du fait de la forte homologie, en particulier au niveau extracytoplasmique, entre un récepteur NKR et un récepteur contrepartie de ce NKR (*e.g.* jusqu'à 96% d'homologie entre KIR et KAR), l'utilisation d'anticorps ne permet en effet souvent pas de discriminer entre des NKR qui sont inhibiteurs et leurs contreparties à fonctions activatrices, ou à tout le moins non inhibitrices. Les amorces oligonucléotidiques actuellement disponibles ne permettent quant à

elles pas la mise en oeuvre d'une amplification en chaîne par polymérase capable de discriminer entre par exemple un NKR p58.1 et un NKR p58.2, ou entre un NKR p70.INH et un NKR p140.INH. Finalement, pour documenter précisément le répertoire en immunorécepteurs NKR et en leurs contreparties, il faut actuellement avoir recours après une étape de purification des récepteurs visés (*e.g.* par FACScan), à une étape de séquençage nucléotidique. La documentation du répertoire NKR /contreparties de NKR n'est donc actuellement pas réalisable en routine dans un contexte de type médical. Le niveau de stimulation et d'inhibition des programmes d'activation des cellules NK et T, et donc le potentiel de résistance d'un individu vis-à-vis du développement d'infections microbiennes ou parasitaires, de maladies auto-immunes, ou bien encore de cellules malignes, ne peut donc être mesuré. Il résulte également de cette absence de moyens adaptés pour la documentation des répertoires NKR/contreparties de NKR que les effets sélectifs de type GVL ne peuvent être utilisés en thérapie, et que les réactions GVH ou de rejets lors de greffes ou de transplantations allo- ou xéno-géniques ne peuvent être complètement écartées.

La présente invention propose donc des moyens permettant de documenter, pour un échantillon biologique donné, les répertoires en immunorécepteurs NKR et en immunorécepteurs contreparties activatrices ou à tout le moins non inhibitrices de récepteurs NKR. Ces moyens permettent notamment de distinguer aisément entre un récepteur NKR et sa contrepartie activatrice ou non inhibitrice, ainsi que de distinguer entre différents récepteurs NKR, ou entre différentes contreparties de NKR. Elle vise également les applications biologiques, et en particulier médicales et vétérinaires, de ces moyens. L'un des aspects essentiels selon l'invention consiste à considérer l'ensemble des immunorécepteurs NKR et contreparties de NKR comme un répertoire, c'est-à-dire comme un ensemble cohérent, formant une unité par rapport à un type d'activité, en l'occurrence, de manière particulièrement avantageuse, le contrôle de l'activation lymphocytaire de

l'homme ou l'animal dont est issu ledit échantillon biologique (contrôle négatif pour le répertoire des récepteurs NKR, contrôle positif pour le répertoire des contreparties de NKR). L'invention fournit, pour la première fois, des moyens permettant de documenter, en routine dans un contexte médical ou vétérinaire, des répertoires NKR et/ou contreparties de NKR, de manière à pouvoir analyser rapidement et efficacement des situations physiologiques et pathologiques liées à ces répertoires.

Les moyens selon l'invention présentent notamment l'avantage d'être aisément utilisables dans un contexte médical ou vétérinaire, par exemple en hôpital ou clinique.

La présente invention a pour objet une méthode *in vitro* de documentation d'un répertoire en immunorécepteur(s) NKR comprenant notamment les récepteurs KIR p58.1, p58.2, p70.INH, p140.INH, et les récepteurs NKG2A et NKG2B, et/ou d'un répertoire en immunorécepteur(s) contrepartie(s) de NKR, comprenant notamment les récepteurs KAR p50.1, p50.2, p70.ACT, p140.ACT, et les récepteurs NKG2C, NKG2D, NKG2E, NKG2F, ces immunorécepteurs étant ci-après désigné(s) récepteur(s) cible(s), caractérisée en ce qu'elle comprend :

- i. l'utilisation d'au moins une paire d'oligonucléotides, l'un étant désigné oligonucléotide 3' et l'autre oligonucléotide 5', les oligonucléotides 3' et 5' d'une même dite paire étant tous deux capables, dans des conditions d'hybridation correspondant à une incubation pendant 1 min dans un tampon [Tris-HCl 20mM pH8,4; KCl 50mM; MgCl₂ 2,5mM] à une température comprise entre 50°C et 65°C environ, de s'hybrider à l'ADN ou à l'ADNc d'un récepteur cible NKR, ou contrepartie de NKR, mais ne s'hybridant pas, dans les mêmes conditions d'hybridation, avec l'ADN ou l'ADNc d'un récepteur contrepartie de NKR, ou respectivement d'un récepteur NKR, contrepartie fonctionnelle dudit récepteur cible,
- ii. la mise en contact de populations ADN ou ADNc d'un échantillon

biologique d'origine humaine ou animale pour lequel on souhaite documenter le répertoire en immunorécepteur(s) cible(s), avec un excès d'au moins une paire d'oligonucléotides 3' et 5' selon i. dans des conditions favorables à l'hybridation de cette paire oligonucléotides 3' et 5' sur les ADN ou sur les ADNc de l'échantillon biologique, et

iii. la détection des hybrides éventuellement formés entre ces ADN ou ADNc et la ou les paire(s) d'oligonucléotides 3' et 5'.

Par contrepartie fonctionnelle d'un récepteur, nous entendons dans la présente demande un récepteur à structure homologue, en particulier au niveau extracytoplasmique, mais à fonction différente : par exemple, une contrepartie fonctionnelle du récepteur NKR p58.1 est le récepteur contrepartie de NKR p50.1, et réciproquement; de même le récepteur NKR p58.2 et le récepteur contrepartie de NKR p50.2 sont l'un pour l'autre des contreparties fonctionnelles.

La présente méthode permet donc notamment de distinguer un récepteur NKR (ou contrepartie de NKR) d'un récepteur contrepartie fonctionnelle de ce récepteur.

La (ou les) paire(s) d'oligonucléotides 3' et 5' est (sont) en particulier capables de borner, sur l'ADN ou l'ADNc d'un récepteur cible qui leur correspond, une séquence d'oligonucléotides (bornes incluses) qui est absente de la séquence ADN ou ADNc d'un récepteur avec lequel elle(s) est (sont) capable(s) de ne pas s'hybrider dans les conditions d'hybridation données sous i) ci-dessus.

De manière avantageuse, ladite ou au moins une desdites paire(s) d'oligonucléotides 3' et 5' utilisée(s) est en outre capable, dans les mêmes conditions d'hybridation que celles définies sous i., de ne pas s'hybrider à l'ADN ou ADNc d'un récepteur, indifféremment NKR ou contrepartie de NKR, autre que ledit récepteur cible.

Selon une disposition particulière de cette manière avantageuse, ladite (ou

au moins une desdites) paire(s) d'oligonucléotides 3' et 5' capable, dans les conditions d'hybridation définies sous i. ci-dessus, de s'hybrider à l'ADN ou l'ADNc d'un récepteur p58.1 (ou p50.1), et de ne pas s'hybrider à l'ADN ou l'ADNc d'un récepteur p50.1 (ou respectivement p58.1) est en outre capable de ne pas s'hybrider dans les mêmes conditions d'hybridation à l'ADN ou l'ADNc d'un récepteur p58.2 ou p50.2.

Selon une deuxième disposition particulière de cette manière avantageuse, ladite, ou au moins une desdites, paire(s) d'oligonucléotides 3' et 5' capable, dans les conditions d'hybridation définies sous i. ci-dessus, de s'hybrider à l'ADN ou l'ADNc d'un récepteur p58.2 (ou p50.2), et de ne pas s'hybrider à l'ADN ou l'ADNc d'un récepteur p50.2 (ou respectivement p58.2) est en outre capable de ne pas s'hybrider dans les mêmes conditions d'hybridation à l'ADN ou l'ADNc d'un récepteur p58.1 ou p50.1.

Selon une troisième disposition particulière de cette manière avantageuse, ladite (ou au moins une desdites) paire(s) d'oligonucléotides 3' et 5' capable, dans les conditions d'hybridation définies sous i. ci-dessus, de s'hybrider à l'ADN ou l'ADNc d'un récepteur p70.INH (ou p70.ACT), et de ne pas s'hybrider à l'ADN ou l'ADNc d'un récepteur p70.ACT (ou respectivement p70.INH) est en outre capable de ne pas s'hybrider dans les mêmes conditions d'hybridation à l'ADN ou l'ADNc d'un récepteur p140.INH ou p140.ACT.

Selon une quatrième disposition particulière de cette manière avantageuse, ladite, ou au moins une desdites, paire(s) d'oligonucléotides 3' et 5' capable, dans les conditions d'hybridation définies sous i. ci-dessus, de s'hybrider à l'ADN ou l'ADNc d'un récepteur p140.INH (ou p140.ACT), et de ne pas s'hybrider à l'ADN ou l'ADNc d'un récepteur p140.ACT (ou respectivement p140.INH) est en outre capable de ne pas s'hybrider dans les mêmes conditions d'hybridation à l'ADN ou l'ADNc d'un récepteur p70.INH ou p70.ACT.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, l'oligonucléotide 5'

d'une dite paire d'oligonucléotides 3' et 5' utilisée pour un récepteur cible NKR (ou contrepartie de NKR) est capable, dans les conditions d'hybridation définies sous i. ci-dessus, de s'hybrider à l'ADN ou à l'ADNc d'un récepteur contrepartie de NKR (ou respectivement NKR), contrepartie fonctionnelle dudit récepteur cible NKR (ou respectivement contrepartie de NKR). Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, la séquence de l'oligonucléotide 5' d'une dite paire d'oligonucléotides 3' et 5' utilisée pour un récepteur cible NKR (ou contrepartie de NKR) comprend la séquence de l'oligonucléotide 5' d'une autre dite paire d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur contrepartie de NKR (ou respectivement NKR), contrepartie fonctionnelle dudit récepteur cible NKR (ou respectivement contrepartie de NKR).

Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, l'oligonucléotide 3' d'une dite paire d'oligonucléotides 3' et 5', utilisée pour un récepteur cible KAR, est capable, dans les mêmes dites conditions d'hybridation, de s'hybrider à l'ADN ou ADNc dudit récepteur cible KAR au niveau d'un enchaînement nucléotidique qui comprend une séquence correspondant, selon le code génétique universel, et en tenant compte de la dégénérescence dudit code, à la séquence d'acides aminés Lys Ile Pro Phe Thr Ile (K I P F T I) ou Lys Leu Pro Phe Thr Ile (K L P F T I) (SEQ ID n°26 ou 27).

Selon un mode de réalisation particulièrement avantageux de l'invention, ladite (ou au moins une desdites) paire(s) d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur KIR est choisie parmi le groupe de paires d'oligonucléotides 3' et 5' constitué par :

un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°1, ou une séquence en dérivant, et au moins un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°5, n°2, n°6 ou n°7, ou une séquence en dérivant,

un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°4, ou une séquence en dérivant, et au moins un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°5,

n°2, n°6 ou n°7, ou une séquence en dérivant,
un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°9, ou une séquence en dérivant, et au moins un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°5, n°2, n°6 ou n°7, ou une séquence en dérivant,
au moins un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°10, n°11, n°12, ou n°13, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°14, ou une séquence en dérivant.

Par séquence dérivant d'une première séquence, nous entendons dans la présente demande une séquence dérivée de la première notamment par inversion, délétion, addition, ou substitution de nucléotide(s), et présentant les propriétés d'hybridation que l'acide nucléique correspondant à la première séquence présente dans les conditions i. ci-avant définies.

Selon une disposition de ce mode de réalisation particulièrement avantageux, ladite paire d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur p58.1 correspond à un oligonucléotide 5' comprenant la SEQ ID n°1, ou une séquence en dérivant, et un équilibre de quatre oligonucléotides 3', chacun d'eux comprenant la SEQ ID n°5, n°2, n°6 ou n°7, ou une séquence en dérivant.

Selon une autre disposition de ce mode de réalisation particulièrement avantageux, ladite paire d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur p58.2 correspond à un oligonucléotide 5' comprenant la SEQ ID n°4, ou une séquence en dérivant, et un équilibre de quatre oligonucléotides 3', chacun d'eux comprenant la SEQ ID n°5, n°2, n°6 ou n°7, ou une séquence en dérivant.

Selon encore une autre disposition de ce mode de réalisation particulièrement avantageux, ladite paire d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur p70.INH correspond à un oligonucléotide 5' comprenant la SEQ ID n°9, ou une séquence en dérivant, et un équilibre de

quatre oligonucléotides 3', chacun d'eux comprenant la SEQ ID n°5, n°2, n°6 ou n°7, ou une séquence en dérivant.

Selon encore une autre disposition de ce mode de réalisation particulièrement avantageux, ladite paire d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur p140.INH correspond à un équilibre de quatre oligonucléotides 5', chacun d'eux comprenant la SEQ ID n°10, n°11, n°12 ou n°13, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la SEQ ID n°14, ou une séquence en dérivant.

Selon un autre mode de réalisation particulièrement avantageux de l'invention, ladite (ou au moins une desdites) paire(s) d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur KAR est choisie parmi le groupe de paires d'oligonucléotides 3' et 5' constitué par :

- un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°1, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°3, ou une séquence en dérivant,
- un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°8, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°3, ou une séquence en dérivant,
- un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°9, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°3, ou une séquence en dérivant,
- un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°15, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°3, ou une séquence en dérivant.

Selon une disposition de cet autre mode de réalisation particulièrement avantageux, ladite paire d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur p50.1 correspond à un oligonucléotide 5' comprenant la SEQ ID n°1, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la SEQ ID n°3, ou

une séquence en dérivant.

Selon une autre disposition de cet autre mode de réalisation particulièrement avantageux, ladite paire d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur p50.2 correspond à un oligonucléotide 5' comprenant la SEQ ID n°8, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la SEQ ID n°3, ou une séquence en dérivant.

Selon encore une autre disposition de cet autre mode de réalisation particulièrement avantageux, ladite paire d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur p70.ACT correspond à un oligonucléotide 5' comprenant la SEQ ID n°9, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la SEQ ID n°3, ou une séquence en dérivant.

Selon encore une autre disposition de cet autre mode de réalisation particulièrement avantageux, ladite paire d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur p140.ACT correspond à un oligonucléotide 5' comprenant la SEQ ID n°15, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la SEQ ID n°3, ou une séquence en dérivant.

Selon encore un autre mode de réalisation particulièrement avantageux de l'invention, ladite (ou au moins une desdites) paire(s) d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur NKG2 est choisie parmi le groupe de paires d'oligonucléotides 3' et 5' constitué par :

- un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°16, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°17, ou une séquence en dérivant,
- un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°18, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°17, ou une séquence en dérivant,
- un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°19, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID

n°17, ou une séquence en dérivant,

- un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°20, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°21, ou une séquence en dérivant.

Selon une première disposition de cet encore autre mode de réalisation particulièrement avantageux, ladite paire d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur NKG2A (inhibiteur) correspond à un oligonucléotide 5' comprenant la SEQ ID n°16, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la SEQ ID n°17, ou une séquence en dérivant.

Selon une deuxième disposition de cet encore autre mode de réalisation particulièrement avantageux, ladite paire d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur NKG2B (inhibiteur) correspond à un oligonucléotide 5' comprenant la SEQ ID n°18, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la SEQ ID n°17, ou une séquence en dérivant.

Selon une troisième disposition de cet encore autre mode de réalisation particulièrement avantageux, ladite paire d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur NKG2C (activateur) correspond à un oligonucléotide 5' comprenant la SEQ ID n°19, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la SEQ ID n°17, ou une séquence en dérivant.

Selon une quatrième disposition de cet encore autre mode de réalisation particulièrement avantageux, ladite paire d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur NKG2D (activateur) correspond à un oligonucléotide 5' comprenant la SEQ ID n°20, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la SEQ ID n°21, ou une séquence en dérivant.

Lesdites conditions favorables à l'hybridation de la ou des paires d'oligonucléotides 3' et 5' mises en contact avec l'ADN ou l'ADNc de l'échantillon biologique correspondent avantageusement à une incubation pendant 1 min dans un tampon [Tris-HCl 20mM pH8,4; KCl 50mM; MgCl₂ 2,5mM] à une

température comprise entre 50°C et 65°C environ. De telles conditions sont en particulier présentées dans les exemples.

De manière avantageuse, les deux oligonucléotides 3' ou 5' d'une même dite paire sont chacun couplés à un marqueur, notamment couplée à un marqueur fluorescent ou radioactif, tel que du ^{32}P , permettant la révélation des hybrides qu'ils forment éventuellement avec lesdites populations ADN ou ADNc dudit échantillon biologique.

De manière également avantageuse, ladite (ou lesdites) paire(s) d'oligonucléotide(s) 3' et 5' sert (servent) d'amorces respectivement 3' et 5' pour une extension par ADN polymérase, telle qu'une Taq polymérase. Des conditions favorables à une telle extension comprennent, outre l'ajout d'ADN polymérase, l'ajout des 4 dNTP (désoxyribonucléoside-triphosphate) en présence d'un tampon de type Tris-HCl.

Lesdits hybrides éventuellement formés sont alors, préalablement à leur détection, amplifiés par au moins une PCR (amplification en chaîne par polymérase; cf. les brevets EP 201 184 et EP 200 362) ou RT-PCR dans le cas d'ADNc rétrotranscrit à partir d'ARNm. Le cas échéant, lesdits hybrides éventuellement formés sont amplifiés par "Nested PCR" (double PCR emboîtée). Des exemples de conditions favorables à l'amplification par PCR sont donnés dans les exemples.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, ladite détection des hybrides éventuellement formés comprend en outre la résolution sur gel de polyacrylamide du mélange réactionnel issu de la mise en contact, ainsi que la révélation de la présence ou de l'absence de bandes électrophorétiques contenant lesdits hybrides éventuellement formés.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, le répertoire en immunorécepteurs documenté est quantifié par référence aux quantités de b-actine mesurées sur le même échantillon biologique, ou par référence aux

quantités d'une molécule spécifique d'un type cellulaire présentes dans ledit échantillon biologique, tel que notamment les molécules CD56 pour les cellules NK.

La méthode selon l'invention peut être appliquée à la documentation d'un répertoire génotypique en immunorécepteurs NKR et/ou en immunorécepteurs contreparties de NKR : l'étape ii. de mise en contact définie ci-dessus est alors réalisée avec les populations ADN génomique de l'échantillon biologique.

La méthode selon l'invention peut également être appliquée à la documentation d'un répertoire d'expression en immunorécepteurs NKR et/ou en immunorécepteurs contreparties de NKR : l'étape ii. de mise en contact définie ci-dessus est alors réalisée avec les populations ADNc, rétro-transcrites des populations ARNm de l'échantillon biologique.

Des échantillons biologiques d'origine humaine ou animale particulièrement appropriés à la mise en oeuvre de la méthode selon l'invention comprennent du sang périphérique, de la moelle osseuse, des lymphocytes, des cellules NK et/ou T, des cellules transgéniques exprimant des immunorécepteurs, une fraction isolée à partir de ces échantillons.

La méthode selon l'invention peut être notamment appliquée au criblage d'une banque d'organes, de tissus ou de cellules.

Elle permet ainsi une meilleure prévision :

- de l'acceptation ou de rejet, par un homme ou un animal, de cellules, d'un tissu ou d'un organe génétiquement différent(es),
- de l'inocuité ou de la pathogénicité (effet GVH), pour un homme ou un animal, d'une greffe ou transplantation, en particulier de cellules, tissu, ou organe génétiquement différent(es),
- d'un effet potentiel de type GVL que des cellules, un tissu ou un organe génétiquement différent(es) pourraient exercer sur un homme ou animal.

La méthode selon l'invention permet également le suivi de l'éventuelle

apparition de telles réactions après greffe ou transplantation allo- ou xénogénique.

La méthode selon l'invention peut également être appliquée à la détermination de l'état d'activation de cellules NK et/ou T à un instant donné chez un animal ou un homme. Elle permet alors la prévision ou le suivi de l'état de résistance d'un animal ou d'un homme vis-à-vis d'une infection virale, telle qu'une infection par un VIH, d'une infection parasitaire, telle que la malaria, d'une infection bactérienne, vis-à-vis d'une maladie auto-immune, telle que la polyarthrite rhumatoïde, ou bien encore vis-à-vis du développement de cellules malignes telles que des cellules leucémiques. L'utilisation prévisionnelle de la méthode selon l'invention est d'un intérêt particulier dans le cadre d'épidémies.

La méthode selon l'invention peut également être avantageusement appliquée au criblage de médicaments actifs vis-à-vis de maladies infectieuses, de maladies auto-immunes, ou de maladies tumorales.

La présente invention a également pour objet un kit pour la mise en oeuvre de ladite méthode comprenant dans un récipient, au moins une dite paire d'oligonucléotides, les réactifs pour la réalisation de ladite ou lesdites méthode(s) tels que tampon, marqueur (éventuellement couplé aux oligonucléotides de la dite paire), ainsi qu'un mode d'emploi.

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention apparaîtront encore à travers les exemples de réalisation suivants, donnés à titre indicatif et non limitatifs.

Lesdits exemples font référence aux Figures 1 et 2 :

La Figure 1 représente les produits issus d'une amplification par PCR (amplification en chaîne par polymérase après RT transcription enzymatique inverse à l'aide de paires d'oligonucléotides selon l'invention servant d'amorces), des séquences codantes pour p50.2 (Fig. 1A) et p58.2 (Fig.1B) dans des cellules NK humaines;

La Figure 2 représente les produits issus d'une amplification par PCR de la

séquence codante pour p50.2 à partir du DNA génomique de souris transgéniques p50.2⁺.

Exemple 1 : Documentation du répertoire NKR/contreparties de NKR exprimé par une population de cellules NK humaines (RT-PCR).

1. Préparation des ARN

Des préparations ARN ont été réalisées à partir de cellules NK humaines clonées et phénotypées p50.2⁺ et/ou p58.2⁺. La technique immunologique ne permet pas de documenter précisément un tel répertoire : l'anticorps GL183 (Immunotech) reconnaît à la fois le récepteur NKR inhibiteur p58.2 et sa contrepartie activatrice p50.2. Des cellules NK humaines clonées et phénotypées p50.2⁻ et p58.2⁻ à l'aide de l'anticorps GL183 servent de témoins négatifs.

Les préparations ARN sont réalisées comme suit.

Extraction

100 µl de Trizol (Gibco BRL catégorie n°15596-026) ont été ajoutés à 10⁶ cellules. On mélange en pipetant plusieurs fois, sans utiliser de mélangeur à vortex. On laisse la solution 5 minutes à température ambiante puis on ajoute 20 µl de chloroforme sans alcool isoamylique. On mélange à nouveau sans utiliser de mélangeur à vortex et on laisse la solution se reposer 5 minutes à température ambiante. On centrifuge alors à 4°C pendant 15 minutes de manière à bien séparer la phase organique inférieure, qui contient l'ADN, de la phase aqueuse supérieure qui contient l'ARN. On récupère la phase aqueuse sans perturber l'interface entre phase aqueuse et phase organique.

Précipitation

50 µl d'isopropanol sont ajoutés à la phase aqueuse et on laisse l'ARN précipiter pendant 15 minutes à température ambiante. On centrifuge alors pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est éliminé, et le culot est lavé avec 100 µl d'éthanol à 70%. Après centrifugation pendant 5 minutes à 4°C (7500 g), on laisse sécher à l'air libre (sans sécher sous vide). Le culot d'ARN est remis en

suspension dans 20 ml d'H₂O.

2. Préparation des paires d'oligonucléotides

Le tableau 1 ci-dessous présente les paires d'oligonucléotides utilisées. Sont ici rapportés les résultats relatifs à l'utilisation des paires d'oligonucléotides C (SEQ ID n°4 en tant qu'oligonucléotide 5' et un équimélange de SEQ ID n°5, n°2, n°6 et n°7 en tant qu'oligonucléotide 3') et D (SEQ ID n°8 en tant qu'oligonucléotide 5' et SEQ ID n°3 en tant qu'oligonucléotide 3') présentées dans le tableau 1. Les séquences ADNc, sur la base desquelles ces paires d'oligonucléotides ont été mises au point, sont présentées dans le tableau 2 ci-dessous (nom des clones ADNc et numéro d'accès sur Genbank). Pour chaque paire d'oligonucléotides, ont ainsi été pris en compte les variants alléliques et les variants d'excision-épissage (épissage alternatif) connus d'un même récepteur.

Chaque paire d'oligonucléotides est construite, après alignement des séquences ADNc connues des différents variants d'un même récepteur cible (*e.g.* le KIR p58.2), de manière à ce que cette paire puisse déterminer, sur l'ensemble de ces variants, les bornes d'un fragment consensus, sans pour autant pouvoir faire de même sur un quelconque variant du récepteur contrepartie du récepteur cible (*e.g.* le KAR p50.2). La séquence de chaque oligonucléotide d'une même paire est ensuite optimisée de manière à ce que la température d'anneau (annealing en anglais) de chacune d'elles soit proche (*e.g.* $\Delta T \leq 5^\circ\text{C}$).

Chaque oligonucléotide présente en effet une température d'anneau (ou d'hybridation) qui lui est propre. Cette température d'anneau est fonction du

rapport $R = \frac{G + C}{\text{nombre total de bases}} \times 100$ et de la longueur de l'oligonucléotide

$$(A + T + G + C)$$

considéré, selon la formule : Température d'anneau (ou d'hybridation) d'un oligonucléotide =

$$T_m = 69,3 + 0,41(R) - \frac{650}{\text{longueur en pb}} \text{ (en } ^\circ\text{C)}$$

Or, dans une réaction de type amplification en chaîne par polymérase les oligonucléotides d'une même paire doivent pouvoir tous deux s'anneler au récepteur cible dans des conditions de réaction communes, ceci afin de servir d'amorces à l'amplification du fragment consensus. Si les oligonucléotides d'une même paire présentent des températures propres d'annelage proches (*e.g.* 54°C et 56°C), ils pourront s'hybrider au récepteur cible, sans pour autant s'hybrider au récepteur contrepartie correspondant, à une température de 54°C ou 55°C.

Si les oligonucléotides d'une même paire présentent par contre des températures propres d'annelage très distantes (*e.g.* 49°C et 56°C), la réaction d'hybridation au récepteur cible est préférentiellement conduite à la plus basse des deux températures (*e.g.* 49°C ou 50°C), ce qui permet de maintenir la reconnaissance de sa cible nucléotidique par l'oligonucléotide dont la température propre d'annelage est la plus basse. Dans cette situation, une diminution de spécificité peut toutefois intervenir : il peut être observé que certaines paires d'oligonucléotides parviennent, dans de telles conditions de température, à s'hybrider au récepteur-contrepartie du récepteur cible. Une manière de remédier à cette perte de spécificité consiste à augmenter la longueur de l'oligonucléotide dont la température propre d'annelage est la plus basse, sans faire perdre à la paire d'oligonucléotides considérée sa spécificité.

3. Amplification en chaîne par polymérase après transcription enzymatique inverse (RT-PCR)

5 µg d'ARN totaux sont transcrits en ADNc par incubation avec une transcriptase inverse (RT) à l'aide du kit First Strand DNA-Ready to go (Pharmacia). 10 µl d'ADNc sur les 33 µl obtenus sont mis en contact avec les paires d'oligonucléotides C et D qui servent alors d'amorces (cf. tableau 1): 10 µl de produit issu de RT; Tampon PCR 10X : 10µl; MgCl₂ 50mM; dXTP 10 mM; Oligonucléotides 3' à 10 µM : 5 µl; Oligonucléotide 5' 10 µM : 5 µl; Taq polymérase : 0,5 µl; H₂O : qsp 100 µl. L'amplification par PCR (DNA engine

PTC 200, MJ Research, Massachussets) est réalisée en suivant les étapes suivantes :

- étape n°1 (dénaturation initiale) : 5 min à 94°C,
- étape n°2 : 35 cycles comprenant
 - a) dénaturation 1 min à 94°C
 - b) annelage 1 min à 55°C pour la paire C et 50°C pour la paire D d'oligonucléotides,
 - c) extension 1 min à 72°C,
- étape n°3 : (extension finale) :
1 min à 72°C.

La durée de l'extension 2c peut être augmentée si le fragment à amplifier a une grande taille (*e.g.* supérieure à 1000-1400pb environ).

La température de l'étape d'anneiage 2b dépend de la paire d'oligonucléotides utilisés comme amorces (*cf.* point 2. ci-avant). Elle correspond à une température consensus entre les températures propres d'anneiage de chacun des deux oligonucléotides faisant paire (température moyenne ou température la plus basse des deux). Cette température est généralement comprise entre 45°C et 70°C, préférentiellement entre 50°C et 65°C.

10 µl des produits issus de l'amplification par RT-PCR sont résolus par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% en parallèle avec des marqueurs de poids moléculaires (M).

Les résultats sont illustrés sur les figures 1A et 1B.

La figure 1 illustre l'amplification par PCR après RT (transcription enzymatique inverse) des séquences codantes pour p58.2 et p50.2 de cellules NK humaines.

En figure 1A est illustrée le résultat de la résolution électrophorétique des produits issus de l'amplification par RT-PCR après mise en contact de la paire d'amorces D selon l'invention (*cf.* tableau 1) avec les populations ADNc de

cellules NK humaines phénotypées $p50.2^+$ et $p58.2^+$ (piste +) à l'aide de l'anticorps GL183, ou avec les populations ADNc de cellules NK humaines phénotypées $p50.2^-$ et $p58.2^-$ (piste -) à l'aide de ce même anticorps GL183. En piste M, sont résolus des marqueurs de poids moléculaire.

En figure 1B, est illustrée le résultat de la résolution électrophorétique des produits issus de l'amplification par RT-PCR après mise en contact de la paire d'amorces C selon l'invention (cf. tableau 1) avec les populations ADNc de cellules NK humaines phénotypées $p50.2^+$ et $p58.2^+$ (piste +) à l'aide de l'anticorps GL183, ou avec les populations ADNc de cellules NK humaines phénotypées $p50.2^-$ et $p58.2^-$ (piste -) à l'aide de ce même anticorps GL183. En piste M, sont résolus des marqueurs de poids moléculaire.

Il peut être observé que les paires d'oligonucléotides C et D selon l'invention permettent de reconnaître respectivement un phénotype, respectivement, $p58.2^+$ et $p50.2^+$, en reconnaissant un fragment de, respectivement, 653 pb et 533pb. La méthode selon l'invention permet donc de discriminer entre un phénotype $p58.2^+$ (récepteur KIR, à fonction inhibitrice) et un phénotype $p50.2^+$ (récepteur KAR, contrepartie de $p58.2$, à fonction activatrice), ce qui n'était jusqu'à présent pas réalisable sous séquençage.

Exemple 2 : Documentation du répertoire génétique (potentiel) NKR/contreparties de NKR d'une population de splénocytes de souris transgéniques $p50.2^+$ (PCR).

1 - Préparation des ADN

Des préparations ADN ont été réalisées à partir de splénocytes de souris transgéniques $p50.2^+$. La technique immunologique ne permet pas de déterminer si de tels splénocytes sont $p50.2^+$ (récepteur KAR, activateur) ou $p58.2^+$ (récepteur KIR, inhibiteur, ou bien encore $p50.2^+$ et $p58.2^+$). Des splénocytes de souris non transgéniques ($p50.2^-$) servent de témoins négatifs.

Extraction

Cette étape est réalisée comme décrit en exemple 1. Les ADN étant contenus dans la phase organique inférieure, c'est ici cette phase qui est récupérée après avoir éliminé la phase aqueuse et un peu d'interface.

Précipitation

On ajoute 30 µl d'éthanol à 100% et on laisse reposer 5 minutes à température ambiante. Après centrifugation pendant 5 minutes à 4°C (2 000g), on jette le surnageant et on lave le culot avec 100 µl de citrate de sodium 0,1M dans de l'éthanol à 10%. On laisse 30 minutes à température ambiante en mélangeant de temps en temps. On centrifuge pendant 5 minutes à 4°C (2 000g). On répète ce lavage une seconde fois.

Le culot d'ADN obtenu est remis en suspension dans 200 µl d'éthanol à 70%. On laisse 15 minutes à température ambiante en mélangeant de temps en temps et on centrifuge pendant 5 minutes à 4°C (2 000g).

Le culot est mis à sécher brièvement sous vide (1 à 2 µg d'ADN environ sont obtenus) et est remis en suspension dans 10 µl de NaOH 8mM. En cas de présence de matériel insoluble, on microcentrifuge 10 minutes à température ambiante. On transfère le surnageant dans un nouveau tube. Le pH est neutralisé en ajoutant 1,25 µl d'Hepes 0,1 M pour 10 µl.

2 - Préparation des paires d'oligonucléotides

Les paires d'oligonucléotides sont préparées comme décrit en exemple 1. Sont ici rapportés les résultats relatifs à la paire D d'oligonucléotides (SEQ ID n°8 en tant qu'oligonucléotide 5' et SEQ ID n°3 en tant qu'oligonucléotide 3') selon l'invention (cf. tableau 1 ci-dessous).

3 - Amplification en chaîne par polymérase (PCR)

L'amplification en chaîne par polymérase est réalisée comme décrit en exemple 1 en mettant en contact les préparations d'ADN génomiques obtenues avec des paires d'oligonucléotides D servant alors d'amorces.

Les produits issus de l'amplification sont résolus sur gel d'agarose à 2% en parallèle avec des marqueurs de poids moléculaires (M).

Les résultats de résolution électrophorétique sur gel d'agarose à 2% des produits issus de la PCR sont illustrés par la figure 2.

La figure 2 illustre l'amplification par PCR de la séquence codante pour p50.2 à partir du DNA génomique de splénocytes de souris transgéniques p50.2⁺ : y est illustrée le résultat de la résolution électrophorétique des produits issus de l'amplification par PCR après mise en contact de la paire d'amorces D selon l'invention (*cf.* tableau 1) avec les populations ADN de splénocytes de souris transgéniques p50.2⁺ (pistes +) ou de souris non transgéniques p50.2⁻ (pistes -). En piste M, sont résolus des marqueurs de poids moléculaires.

Les amorces D selon l'invention permettent de reconnaître un fragment de 533 pb présent sur l'ADN de splénocytes murins p50.2⁺ et absent sur l'ADN de splénocytes murins p50.2⁻.

Des résultats comparables ont été obtenus avec les paires d'oligonucléotides A, B et E à L présentées dans le tableau 1 ci-après et ont également permis de documenter les récepteurs visés (*cf.* colonne "molécule" du tableau 1).

Les répertoires NKR et/ou contreparties de NKR ainsi documentés peuvent être, notamment à l'aide d'études biostatistiques classiques, corrélés à des situations physiologiques ou pathologiques données, liées à ces répertoires, et au contrôle de l'activation des cellules les exprimant en général.

Tableau 1

Paire d'oligo	Molécule	Fonction	Tm	Nom de l'oligo	Séquence de l'oligo (5'-->3')	Séquence	Oligo 5'
A	p58. EB6 (p58. 1)	Inhibiteur	56°C 54°C	p58. 1 FOR ITIM N-term BACK	AGTCGCATGACGCAAGAC CAACTGTG (T/C) (A/G) TATGTCAC	Seq ID N°1 Seq ID N°5, 2, 6, 7	
B	p50. EB6 (p50. 1)	Activateur	56°C 49°C	p58. 1 FOR TM-ACT BACK	AGTCGCATGACGCAAGAC GATGGTGAAAGGGATTTT	Seq ID N°1 Seq ID N°3	
C	p58. 183 (p58. 2)	Inhibiteur	56°C 54°C	p58. 2 FOR ITIM N-term BACK	GGTCCCATGATGCAAGAC CAACTGTG (T/C) (A/G) TATGTCAC	Seq ID N°4 Seq ID N°5, 2, 6, 7.	
D	p50. 183 (p50. 2)	Activateur	56°C 49°C	p58. 2 FOR TM-ACT BACK	GGTCCCATGATGCAAGAC GATGGTGAAAGGGATTTT	Seq ID N°8 Seq ID N°3	
E	p70. INH	Inhibiteur	58°C 54°C	p70. FRO ITIM N-term BACK	CCCGTGGTGATCATGGTC CAACTGTG (T/C) (A/G) TATGTCAC	Seq ID N°9 Seq ID N°5, 2, 6, 7.	
F	p70. ACT	Activateur	58°C 49°C	p70. FOR TM-ACT BACK	CCCGTGGTGATCATGGTC GATGGTGAAAGGGATTTT	Seq ID N°9 Seq ID N°3	
G	p140. INH	Inhibiteur	56°C 58°C	ITIM N-term. FOR Ext C-term BACK	GTGAC (A/G) TAC (A/G) CACAGTTG ACCTGACTGTGGTGCTCG	Seq ID N°10, 11, 12, 13 Seq ID N°14	

Tableau I (suite)

H	p140. ACT	Activateur	58 °C 49 °C	p140. FOR TM-ACT BACK	ACCTACAGATGTTATGGTTCTGTT GATGGTGAAAGGATTTT	Seq ID N°15 Seq ID N°13
I	NKG2A	Inhibiteur	54 °C 54 °C	NKG2A FOR NKG2A/ B/C. BACK	TCTACATTAATAACAGAGGCAC ATCTATAGAAAGCAGACT	Seq ID N°16 Seq ID N°17
J	NKG2 B	Inhibiteur	52 °C 54 °C	NKG2 B FOR NKG2A/ B/C. BACK	ATTCCTCCACGTCATTGT ATCTATAGAAAGCAGACT	Seq ID N°18 Seq ID N°17
K	NKG2C	Activateur	54 °C 54 °C	NKG2C. FOR NKG2A/ B/C. BACK	AGTAAACAAAAGAGGAACCTTC ATCTATAGAAAGCAGACT	Seq ID N°19 Seq ID N°17
L	NKG2D	Activateur	56 °C 58 °C	NKG2D. FOR NKG2D. BACK	AGCAAAAGAGGACCAGGATTTA CACAGTCCCTTTGCATGCAGAT	Seq ID N°20 Seq ID N°21
M	CD56		51 °C 54 °C	5' hCD56 3' hCD56	ATCCAGTACACTGATGAC GTCGATGGATGGTGAAGA	Seq ID N°22 Seq ID N°23
N	Actine		62 °C 64 °C	5' Actine 3' Actine	TACCACCTGGCATCGTGATGGACT TCCTTCTGCATCCTGTGCGCAAT	Seq ID N°24 Seq ID N°25

TABLEAU 2

Paire d'oligonucléotides	nom du CDNA	Numéro d'accès sur Genbank
A	cl-42 NKAT-I cl-47.11	U24076 L41267 U24078
B	X98858 X98892 NKAT-7AA NKAT-9AA	X98585 X98892 L76670 L76672
C	cl-43 NKAT-6AA NKAT-2 FA cl-6 NKAT-2 KIR-023G B NKAT-2A B NKAT-3DA	U24075 L76669 L76663 U24074 L41268 U73395 L76662 L76664
D	cl-49 NKAT-5 X89893 cl-39 NKAT-8 NKAT-5 DA	U24079 L41347 X89893 U24077 L76671 L76667
E	X94262 NKAT-3 NK BI-1 NK BI-2 KIR-103AS KIR-103AST cl-1.1 cl-11 cl-2	X94262 L41269 U31416 U33328 U71199 U73394 X94373 U30274 U30273
F	NKAT-10 KIR-123FM	L76661 U73396
G	NKAT-4 X94374 X93595 X93596 NKAT-4 FA NKAT-4AA cl-5	L41270 X94374 X93595 X93596 L76666 L76665 U30272

Tableau 2 (suite)

I	NKG2A	X5 48 67
J	NKG2 B	X5 48 68
K	NKG2 C	X5 48 69
L	NKG2D	X5 48 70

REVENDICATIONS

1. Méthode *in vitro* de documentation d'un répertoire en
- 5 immunorécepteur(s) NKR comprenant notamment les récepteurs KIR p58.1, p58.2, p70.INH, p140.INH, et les récepteurs NKG2A et NKG2B, et/ou d'un répertoire en immunorécepteur(s) contrepartie(s) de NKR, comprenant notamment les récepteurs KAR p50.1, p50.2, p70.ACT, p140.ACT, et les récepteurs NKG2C, NKG2D, NKG2E, NKG2F, ces immunorécepteurs étant
- 10 ci-après désigné(s) récepteur(s) cible(s), caractérisée en ce qu'elle comprend :
- i. l'utilisation d'au moins une paire d'oligonucléotides, l'un étant désigné oligonucléotide 3' et l'autre oligonucléotide 5', les oligonucléotides 3' et 5' d'une même dite paire étant tous deux capables, dans des conditions d'hybridation correspondant à une incubation pendant 1 min dans un tampon

15 [Tris-HCl 20mM pH8,4; KCl 50mM; MgCl₂ 2,5mM] à une température comprise entre 50°C et 65°C environ, de s'hybrider à l'ADN ou à l'ADNc d'un récepteur cible NKR, ou contrepartie de NKR, mais ne s'hybridant pas, dans les mêmes conditions d'hybridation, avec l'ADN ou l'ADNc d'un récepteur contrepartie de NKR, ou respectivement d'un récepteur NKR,

20 contrepartie fonctionnelle dudit récepteur cible,

 - ii. la mise en contact de populations ADN ou ADNc d'un échantillon biologique d'origine humaine ou animale pour lequel on souhaite documenter le répertoire en immunorécepteur(s) cible(s), avec un excès d'au moins une paire d'oligonucléotides 3' et 5' selon i. dans des conditions favorables à

25 l'hybridation de cette paire oligonucléotides 3' et 5' sur les ADN ou sur les ADNc de l'échantillon biologique, et - iii. la détection des hybrides éventuellement formés entre ces ADN ou ADNc et la ou les paire(s) d'oligonucléotides 3' et 5'.

2. Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite ou au moins une desdites paire(s) d'oligonucléotides 3' et 5' utilisée(s) est en outre capable, dans les mêmes conditions d'hybridation que celles définies sous i., de ne pas s'hybrider à l'ADN ou ADNc d'un récepteur, indifféremment NKR
5 ou contrepartie de NKR, autre que ledit récepteur cible.

3. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que l'oligonucléotide 5' d'une dite paire d'oligonucléotides 3' et 5' utilisée pour un récepteur cible NKR (ou contrepartie de NKR) est capable dans les mêmes dites conditions d'hybridation de s'hybrider à l'ADN
10 ou à l'ADNc d'un récepteur contrepartie de NKR (ou respectivement NKR), contrepartie fonctionnelle dudit récepteur cible NKR (ou respectivement contrepartie de NKR).

4. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que l'oligonucléotide 3' d'une dite paire d'oligonucléotides
15 3'et 5', utilisée pour un récepteur cible KAR, est capable, dans les mêmes dites conditions d'hybridation, de s'hybrider à l'ADN ou ADNc dudit récepteur cible KAR au niveau d'un enchaînement nucléotidique qui comprend une séquence correspondant, selon le code génétique universel, et en tenant compte de la dégénérescence dudit code, à la séquence d'acides
20 aminés Lys Ile Pro Phe Thr Ile (K I P F T I) ou Lys Leu Pro Phe Thr Ile (K L P F T I) (SEQ ID n°26 ou 27).

5. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que ladite (ou au moins une desdites) paire(s) d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur KIR est
25 choisie parmi le groupe de paires d'oligonucléotides 3' et 5' constitué par :
un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°1, ou une séquence en dérivant, et au moins un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°5, n°2, n°6 ou n°7, ou une séquence en dérivant,

un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°4, ou une séquence en dérivant, et au moins un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°5, n°2, n°6 ou n°7, ou une séquence en dérivant,

un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°9, ou une séquence en dérivant, et au moins un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°5, n°2, n°6 ou n°7, ou une séquence en dérivant,

au moins un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°10, n°11, n°12, ou n°13, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°14, ou une séquence en dérivant.

10 6. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que ladite (ou au moins une desdites) paire(s) d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur KAR est choisie parmi le groupe de paires d'oligonucléotides 3' et 5' constitué par :

- un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°1, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°3, ou une séquence en dérivant,

- un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°8, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°3, ou une séquence en dérivant,

20 - un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°9, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°3, ou une séquence en dérivant,

- un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°15, ou une séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°3, ou une séquence en dérivant.

7. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que ladite (ou au moins une desdites) paire(s) d'oligonucléotides 3' et 5' ayant pour récepteur cible un récepteur NKG2 est

choisie parmi le groupe de paires d'oligonucléotides 3' et 5' constitué par :
un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°16, ou une séquence
en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°17,
ou une séquence en dérivant,

- 5 un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°18, ou une séquence
en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°17,
ou une séquence en dérivant,

un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°19, ou une séquence
en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ ID n°17,

- 10 ou une séquence en dérivant,

- un oligonucléotide 5' comprenant la séquence SEQ ID n°20, ou une
séquence en dérivant, et un oligonucléotide 3' comprenant la séquence SEQ
ID n°21, ou une séquence en dérivant.

08. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes,
15 caractérisée en ce que les deux oligonucléotides 3' ou 5' d'une même dite
paire sont chacun couplés à un marqueur, notamment couplée à un marqueur
fluorescent ou radioactif, tel que du ^{32}P , permettant la révélation des hybrides
qu'ils forment éventuellement avec lesdites populations ADN ou ADNc dudit
échantillon biologique.

- 20 9. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes,
caractérisée en ce que ladite (ou lesdites) paire(s) d'oligonucléotide(s) 3' et 5'
sert (servent) d'amorces respectivement 3' et 5' pour une extension par ADN
polymérase.

10. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes,
25 caractérisée en ce que lesdits hybrides éventuellement formés sont amplifiés
par au moins une PCR préalablement à leur détection.

11. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes,
caractérisée en ce que lesdits hybrides éventuellement formés sont amplifiés

par "Nested PCR" (double PCR emboîtée).

12. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que ladite détection des hybrides éventuellement formés comprend en outre la résolution sur gel de polyacrylamide du mélange
5 réactionnel issu de la mise en contact, ainsi que la révélation de la présence ou de l'absence de bandes électrophorétiques contenant lesdits hybrides éventuellement formés.

13. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle est appliquée à la documentation d'un répertoire
10 génotypique en immunorécepteurs NKR et/ou en immunorécepteurs contreparties de NKR.

14. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle est appliquée à la documentation d'un répertoire d'expression en immunorécepteurs NKR et/ou en immunorécepteurs
15 contreparties de NKR.

15. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que ledit échantillon biologique d'origine humaine ou animale est du sang périphérique, de la moelle osseuse, des lymphocytes, des cellules NK et/ou T, des cellules transgéniques exprimant des
20 immunorécepteurs, une fraction isolée à partir de ces échantillons.

16. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle est appliquée au criblage d'une banque d'organes, de tissus ou de cellules.

17. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle est appliquée à la prévision ou au suivi de
25 l'acceptation ou du rejet, par un homme ou un animal, de cellules, tissu ou organe génétiquement différent(es).

18. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes,

caractérisée en ce qu'elle est appliquée à la prévision ou au suivi de l'inocuité ou de la pathogénicité (GVH) d'une greffe ou transplantation, par un homme ou un animal, de cellules, tissu ou organe génétiquement différent(es).

5 19. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle est appliquée à la prévision ou au suivi, pour un homme ou un animal, d'un effet de type GVL de la part de cellules, tissu ou organe génétiquement différent(es).

20. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes,
10 caractérisée en ce qu'elle est appliquée à la détermination de l'état d'activation de cellules NK et/ou T à un instant donné chez un animal ou un homme.

21. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle est appliquée à la prévision ou au suivi de l'état de
15 résistance d'un animal ou d'un homme vis-à-vis d'une infection virale, telle qu'une infection par un VIH, d'une infection parasitaire, telle que la malaria, d'une infection bactérienne, vis-à-vis d'une maladie auto-immune, telle que la polyarthrite rhumatoïde, ou bien encore vis-à-vis du développement de cellules malignes telles que des cellules leucémiques.

20 22. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle est appliquée au criblage de médicaments actifs vis-à-vis de maladies infectieuses, de maladies auto-immunes, ou de maladies tumorales.

23. Kit pour la mise en oeuvre de la méthode selon l'une quelconque des
25 revendications 1 à 22, caractérisé en ce qu'il comprend, dans un récipient, au moins une dite paire d'oligonucléotides 3' et 5', les réactifs pour la réalisation de ladite ou lesdites méthode(s) tels que tampon, marqueur (éventuellement couplé aux oligonucléotides de la dite paire), ainsi qu'un mode d'emploi.

1/2

FIGURE 1B

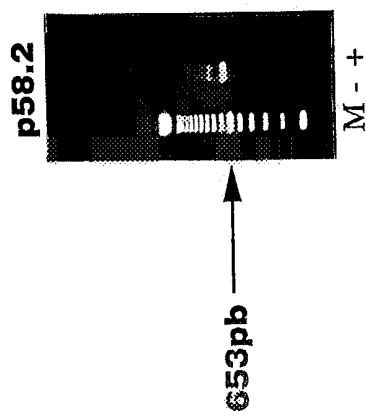


FIGURE 1A

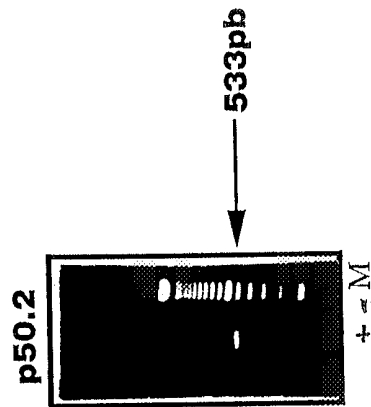
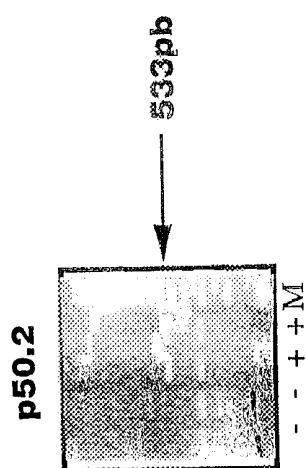


FIGURE 1

2/2

FIGURE 2



LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: I. N. S. E. R. M.
- (B) RUE: 101 rue de Tolbiac
- (C) VILLE: PARIS
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 75654

(ii) TITRE DE L'INVENTION: Méthode de documentation en immunorécepteurs NKR et en immunorécepteurs contreparties de NKR

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 27

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D'EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 18 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(vi) ORIGINE:

- (C) INDIVIDU/ISOLE: p58.1 FOR

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

AGTCGCATGA CGCAAGAC

18

(3) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 18 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(vi) ORIGINE:

- (C) INDIVIDU/ISOLE: ITIM N-term BACK

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

CAACTGTGTG TATGTCAC

18

(4) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 18 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
- (vi) ORIGINE:
(C) INDIVIDU/ISOLE: TM-ACT BACK
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:
- GATGGTGAAA GGGATTTT 18
- (5) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR 18 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
- (vi) ORIGINE:
(C) INDIVIDU/ISOLE: p58.2.FOR
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:
- GGTCCCATGA TGCAAGAC 18
- (6) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR 18 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
- (vi) ORIGINE:
(C) INDIVIDU/ISOLE: ITIM N-term BACK
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:
- CAACTGTGTA TATGTCAC 18
- (7) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR 18 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
- (vi) ORIGINE:
(C) INDIVIDU/ISOLE: ITIM N-term BACK
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:
- CAACTGTGCA TATGTCAC 18

(8) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR 18 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDU/ISOLE: ITIM N-term BACK

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

CAACTGTGCG TATGTCAC

18

(9) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR 18 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDU/ISOLE: p58.2 FOR

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

GGTCCCATGA TGCAAGAC

18

(10) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 9:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR 18 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDU/ISOLE: p70. FOR

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

CCCGTGGTGA TCATGGTC

18

(11) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 10:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR 18 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (vi) ORIGINE:
(C) INDIVIDU/ISOLE: ITIM N-term. FOR
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

GTGACATACA CACAGTTG 18
- (12) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 11:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR 18 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
- (vi) ORIGINE:
(C) INDIVIDU/ISOLE: ITIM N-term. FOR
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

GTGACATACG CACAGTTG 18
- (13) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 12:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR 18 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
- (vi) ORIGINE:
(C) INDIVIDU/ISOLE: ITIM N-term. FOR
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

GTGACGTACA CACAGTTG 18
- (14) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 13:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR 18 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
- (vi) ORIGINE:
(C) INDIVIDU/ISOLE: ITIM N-term. FOR
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

GTGACGTACG CACAGTTG 18
- (15) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 14:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR 18 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDU/ISOLE: Ext C-term BACK

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14:

ACCTGACTGT GGTGCTCG

18

(16) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 15:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR 24 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDU/ISOLE: p140.FOR

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15:

ACCTACAGAT GTTATGGTTC TGTT

24

(17) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 16:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR 21 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDU/ISOLE: NKG2A.FOR

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 16:

TCTACATTAA TACAGAGGCA C

21

(18) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 17:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR 18 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

(vi) ORIGINE:

(C) INDIVIDU/ISOLE: NKG2A/ B/C. BACK

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 17:

ATCTATAGAA AGCAGACT

18

(19) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 18:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR 18 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
(vi) ORIGINE:
(C) INDIVIDU/ISOLE: NKG2 B FOR
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 18:
ATTCCCTCAC GTCATTGT 18
- (20) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 19:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR 21 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
(vi) ORIGINE:
(C) INDIVIDU/ISOLE: NKG2C.FOR
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 19:
AGTAAACAAA GAGGAACCTT C 21
- (21) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 20:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR 21 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
(vi) ORIGINE:
(C) INDIVIDU/ISOLE: NKG2D.FOR
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 20:
AGCAAAGAGG ACCAGGATTT A 21
- (22) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 21:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR 21 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
(vi) ORIGINE:
(C) INDIVIDU/ISOLE: NKG2D. BACK
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 21:
CACAGTCCTT TGCATGCAGA T 21
- (23) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 22:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 18 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
(vi) ORIGINE:
 (C) INDIVIDU/ISOLE: 5' hCD56
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 22:

 ATCCAGTACA CTGATGAC 18
- (24) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 23:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 18 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
(vi) ORIGINE:
 (C) INDIVIDU/ISOLE: 3' hCD56
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 23:

 GTCGATGGAT GGTGAAGA 18
- (25) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 24:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 23 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
(vi) ORIGINE:
 (C) INDIVIDU/ISOLE: 5' Actine
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 24:

 TACCACTGGC ATCGTGATGG ACT 23
- (26) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 25:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 23 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique
(vi) ORIGINE:
 (C) INDIVIDU/ISOLE: 3' Actine
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 25:

 TCCTTCTGCA TCCTGTCGGC AAT 23
- (27) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 26:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR 6 acides aminés
 (B) TYPE: acide aminé
 (C) NOMBRE DE BRINS:
 (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide
(iii) HYPOTHETIQUE: NON
(iv) ANTI-SENS: NON
(vi) ORIGINE:
 (C) INDIVIDU/ISOLE:
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 26
- Lys Ile Pro Phe Thr Ile
1 5

(28) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 27

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR 6 acides aminés
 (B) TYPE: acide aminé
 (C) NOMBRE DE BRINS:
 (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide
(iii) HYPOTHETIQUE: NON
(iv) ANTI-SENS: NON
(vi) ORIGINE:
 (C) INDIVIDU/ISOLE:
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 27
- Lys Leu Pro Phe Thr Ile
1 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/02244

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MINGARI M. C. ET AL.,: "Interleukin-15-induced maturation of human natural killer cells from early thymic precursors: selective expression of CD94/NKG2-a as the only HLA class I-specific inhibitory receptor" EUR. J. IMMUNOLOGY, vol. 27, - June 1997 pages 1374-1380, XP002072518 the whole document & p.1375, 2.6; discussion --- -/--	1,2,17,23



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 January 1999

Date of mailing of the international search report

03/02/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Müller, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 98/02244

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HIBY S.E. ET AL.,: "Human uterine NK cells have a similar repertoire of killer inhibitory and activatory receptors to those found in blood, as demonstrated by RT-PCR and sequencing" MOL. IMMUNOLOGY, vol. 34, no. 5, - April 1997 pages 419-430, XP002090558 see whole doc, esp. abstract and table 1 and 3 ---	1-4,23
X	ADAMKIEWICZ T. V. ET AL.,: "Natural killer lectin-like receptors have divergent carboxy-termini, distinct from C-type lectins" IMMUNOGENETICS, vol. 39, - 1994 page 218 XP002072519 see the whole document ---	1,23
X	YABE T. ET AL.,: "A multigene family on human chromosome 12 encodes natural killer-cell lectins" IMMUNOGENETICS, vol. 37, no. 6, - 1993 pages 455-460, XP002072520 see esp. M&M, discussion ---	1,23
A	BOTTINO C. ET AL.,: "A novel surface molecule homologous to the p58/p50 family of receptors is selectively expressed on a subset of human natural killer cells and induces both triggering of cell functions and proliferation" EUR. J. IMMUNOL., vol. 26, - August 1996 pages 1816-1824, XP002072521 see the whole document ---	
A	CAMBIAGGI A. ET AL.,: "Natural killer cell acceptance of H-2 mismatch bone marrow grafts in transgenic mice expressing HLA-Cw3 specific killer cell inhibitory receptor (CD158b)" PROC. ACAD. SCI. USA, vol. 94, - July 1997 pages 8088-8092, XP002072522 see the whole document -----	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De l'Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle No

PCT/FR 98/02244

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C12Q1/68

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	MINGARI M. C. ET AL.,: "Interleukin-15-induced maturation of human natural killer cells from early thymic precursors: selective expression of CD94/NKG2-a as the only HLA class I-specific inhibitory receptor" EUR. J. IMMUNOLOGY, vol. 27, - juin 1997 pages 1374-1380, XP002072518 le doc.en entier, et p.1375, 2.6; discussion --- -/--	1,2,17, 23

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents ☐ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

21 janvier 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

03/02/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Müller, F

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der e Internationale No

PCT/FR 98/02244

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	HIBY S.E. ET AL.,: "Human uterine NK cells have a similar repertoire of killer inhibitory and activatory receptors to those found in blood, as demonstrated by RT-PCR and sequencing" MOL. IMMUNOLOGY, vol. 34, no. 5, - avril 1997 pages 419-430, XP002090558 see whole doc, esp. abstract and table 1 and 3 ---	1-4,23
X	ADAMKIEWICZ T. V. ET AL.,: "Natural killer lectin-like receptors have divergent carboxy-termini, distinct from C-type lectins" IMMUNOGENETICS, vol. 39, - 1994 page 218 XP002072519 voir le document en entier ---	1,23
X	YABE T. ET AL.,: "A multigene family on human chromosome 12 encodes natural killer-cell lectins" IMMUNOGENETICS, vol. 37, no. 6, - 1993 pages 455-460, XP002072520 see esp. M&M, discussion ---	1,23
A	BOTTINO C. ET L.,: "A novel surface molecule homologous to the p58/p50 family of receptors is selectively expressed on a subset of human natural killer cells and induces both triggering of cell functions and proliferation" EUR. J. IMMUNOL., vol. 26, - août 1996 pages 1816-1824, XP002072521 voir le document en entier ---	
A	CAMBIAGGI A. ET AL.,: "Natural killer cell acceptance of H-2 mismatch bone marrow grafts in transgenic mice expressing HLA-Cw3 specific killer cell inhibitory receptor (CD158b)" PROC. ACAD. SCI. USA, vol. 94, - juillet 1997 pages 8088-8092, XP002072522 voir le document en entier -----	