PCT ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE
Bureau international

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

(51) Classification internationale des brevets [5] : C12N 15/12, 15/63, C12P 21/08 G01N 33/577, A61K 39/36, 37/02 C12Q 1/68	A2	(11) Numéro de publication internationale: WO 92/13950
		(43) Date de publication internationale: 20 août 1992 (20.08.92)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR92/00130

(22) Date de dépôt international: 12 février 1992 (12.02.92)

(30) Données relatives à la priorité:
91/01613 12 février 1991 (12.02.91) FR
91/04523 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 Perronet, 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
Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.

(54) Title: NUCLEOTIDIC SEQUENCES CODING FOR VARIABLE REGIONS OF β CHAINS OF HUMAN T LYMPHOCYTE RECEPTORS, CORRESPONDING PEPTIDIC SEGMENTS AND DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC APPLICATIONS

(54) Titre: SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES CODANT POUR DES REGIONS VARIABLES DE CHAINES β DES RECEPTEURS DES LYMPHOCYTES T HUMAINS, SEGMENTS PEPTIDIQUES CORRESPONDANTS ET LES APPLICATIONS DIAGNOSTIQUES ET THERAPEUTIQUES

(57) Abstract

The invention relates to new nucleotidic sequences coding for variable regions of β chains of human T lymphocyte receptors, the corresponding peptidic segments and the diagnostic and therapeutic applications.

(57) Abrégé

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

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.

AT	Autriche	**FI**	Finlande	**ML**	Mali
AU	Australie	**FR**	France	**MN**	Mongolie
BB	Barbade	**GA**	Gabon	**MR**	Mauritanie
BE	Belgique	**GB**	Royaume-Uni	**MW**	Malawi
BF	Burkina Faso	**GN**	Guinée	**NL**	Pays-Bas
BG	Bulgarie	**GR**	Grèce	**NO**	Norvège
BJ	Bénin	**HU**	Hongrie	**PL**	Pologne
BR	Brésil	**IE**	Irlande	**RO**	Roumanie
CA	Canada	**IT**	Italie	**RU**	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	**JP**	Japon	**SD**	Soudan
CG	Congo	**KP**	République populaire démocratique de Corée	**SE**	Suède
CH	Suisse			**SN**	Sénégal
CI	Côte d'Ivoire	**KR**	République de Corée	**SU**	Union soviétique
CM	Cameroun	**LI**	Liechtenstein	**TD**	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	**LK**	Sri Lanka	**TG**	Togo
DE	Allemagne	**LU**	Luxembourg	**US**	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark	**MC**	Monaco		
ES	Espagne	**MG**	Madagascar		

Séquences nucléotidiques codant pour des régions variables de chaînes β des récepteurs des lymphocytes T humains , segments peptidiques correspondants et les applications diagnostiques et thérapeutiques.

La présente invention concerne de nouvelles séquences nucléotidiques codant pour des régions variables de chaînes β des récepteurs des cellules T, les segments peptidiques 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 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)).

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 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 segments V, D et J pour les locus β et δ et des segments V et J pour les locus α et β. 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 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)). Actuellement, on connaît environ 60 segments géniques Vβ distincts (Wilson et al. (7), Robinson (8), Leider et al. (9), Reynolds (10), Li et al. (11)) qui ont été classés en 20 sous-familles dont 7 avec un seul membre (voir Wilson et al. déjà cité).

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 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 (27 et 28).

Il est par ailleurs connu 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 des chaînes β des récepteurs des cellules T en fournissant de nouveaux segments géniques Vβ appartenant à des nouvelles sous familles ou appartenant à des sous-familles dont on connaît déjà au moins un membre.

La présente invention a ainsi pour objet des séquences nucléotidiques codant pour des régions variables de chaînes β des récepteurs des lymphocytes T humains, correspondant à des ADNc comprenant des séquences nucléotidiques choisies parmi l'un quelconque des segments Vβ correspondant à l'une des séquences SEQ ID N° 2 à 19, et les séquences qui en diffèrent par un ou plusieurs nucléotides.

La présente invention a plus particulièrement pour objet des séquences codant pour des régions variables des chaînes β des récepteurs des lymphocytes T humains, correspondant à des ADNc comprenant des séquences nucléotidiques choisies parmi

l'un quelconque des segments Vβ correspondant à l'une des séquences SEQ ID N° 2 à 5, 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.

La présente invention a également plus particulièrement pour objet :

- des séquences nucléotidiques codant pour des régions variables de chaînes β 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 Vβ correspondant à l'une des séquences SEQ ID N° 2 à 5, et les séquences qui en diffèrent par un ou deux nucléotides,

- des séquences nucléotidiques codant pour des régions variables de chaînes β des récepteurs des lymphocytes T humains correspondant à des ADNc correspondant à l'une des séquences nucléotidiques choisies parmi l'un quelconque des segments Vβ correspondant à l'une des séquences SEQ ID N° 6 à 15, les séquences qui en diffèrent par un ou deux nucléotides et les fragments de celles-ci, notamment les fragments des séquences qui correspondent à tout ou partie des séquences nucléotidiques choisies parmi l'un quelconque des segments Vβ correspondant à l'une des séquences

1 à 155 de SEQ ID N° 8
1 à 125 de SEQ ID N° 9
1 à 111 de SEQ ID N° 10,

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

- des séquences nucléotidiques codant pour des régions variables de chaînes β 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 Vβ correspondant à l'une des séquences

1 à 195 de SEQ ID N° 16
1 à 99 de SEQ ID N° 17

1 à 113 de SEQ ID N° 18

1 à 186 de SEQ ID N° 19,

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 que des fragments de ces séquences, y compris des fragments courts qui trouvent des applications en tant que sondes (généralement comportant au moins 10 nucléotides) ou en tant qu'amorce (comportant généralement au moins 15 nucléotides). La présente invention englobe d'une manière générale l'ensemble des nouveaux oligonucléotides qui sont des fragments des séquences Vβ 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 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.

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 aminoacides et qui possèdent la même fonction. Ces peptides peuvent correspondre à des modifications telles que celles connues avec les mutéines ou à des variations allèliques. Il a en effet été montré en particulier que certains segments géniques codant pour des régions variables de chaînes du récepteur T chez l'homme étaient soumis à un phénomène de polymorphisme génétique appelé variation allèlique (29). La présente invention englobe les peptides provenant de ce phénomène.

Les séquences nucléotidiques selon l'invention ont été 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 Cβ (SEQ ID N° 20) ;

- 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° 21) et d'une amorce B spécifique de la région Cβ (SEQ ID N° 22) ;

- nouvelle amplification par A-PCR à l'aide de ADN polymérase et d'une amorce C spécifique de la région Cβ (SEQ ID N° 23) ;

- insertion dans un vecteur plasmidique ;

- transformation d'un hote bactérien avec le vecteur recombinant ;

- criblage des colonies bactériennes recombinantes avec un oligonucléotide D spécifique de Cβ (SEQ ID N° 24) marqué ;

- extraction des plasmides des colonies positives,

- et séquençage des fragments d'ADN contenant la région Cβ.

La présente invention peut être reproduite notamment par amplification génique bispécifique (polymerase chain reaction ou PCR) en partant de lymphocytes périphériques exprimant les ARNm incluant les segments β variables ou jonctionnels correspondant aux séquences ID N° 2 à 19 de l'invention ou alternativement en appliquant cette technique de PCR à de l'ADN génomique de toute cellule somatique d'un individu pris 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 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.

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 hotes transformés avec ce vecteur.

La présente invention a également pour objet des anticorps 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 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 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 de lymphocytes T humains exprimant les séquences correspondantes à leur surface, y compris des cellules recombinantes transfectées avec les séquences codantes correspondantes.

La présente invention a également pour objet des hybridomes produisant des anticorps monoclonaux dirigés contre les polypeptides selon l'invention.

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 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 papaïne en présence d'un agent réducteur. Les 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 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 constituer des sondes de détection (généralement au moins 10 nucléotides) capables de s'hybrider à une région variable d'une chaîne β ou des amorces pour l'amplification d'ADN (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 β des récepteurs des cellules T dans l'ARNm d'un échantillon d'un patient. 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.

Les anticorps monoclonaux, les fragments ou les dérivés

de ces anticorps selon l'invention 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 β 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 anatomopatho-logique 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 immunospécifiques. Ceci peut être obtenu par exemple dans le cas où l'on utilise un anticorps marqué par un radioisotope.

2 - Les applications dans le domaine thérapeutique

Les oligonucléotides contenus dans les séquences nucléotidiques 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 olignoculéotide antisens spécifique du gène en question (30). 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'inititation de la traduction (ATG). L'intérêt d'une utilisation in vitro d'oligonucléotides antisens spécifique d'un segment génique Vβ est d'abolir (ou de diminuer

fortement) l'expression d'un récepteur T comprenant ce segment Vβ 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 modification pour augmenter la stabilité in vivo et la pénétration à l'intérieur des lymphocytes de ces oligonucléotides.

Les anticorps monoclonaux selon l'invention 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 β 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 β 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 Vβ 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 amino-acides). Ces séquences ou 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 à 6 donnent en alignement à la fois des séquences Vβ connues et des séquences partielles des nouvelles séquences selon l'invention (SEQ ID N° 6 à 19), notées IGRa 08 à IGRa 20 appartenent à des sous-familles Vβ connues. 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 sont surlignées.

- La Fig. 7 donne les analyses par Southern blot de l'ADN génomique traité par une enzyme de restriction en utilisant des sondes spécifiques des sous-familles Vβ. Les enzymes de restriction utilisées sont EcoR I (colonne R), Hind III (colonne H) et BamH I (colonne B). Sur cette Figure, les

triangles marquent les positions des fragments d'ADN s'hybridant de façon spécifique avec Cβ.

- La Fig. 8 représente la détection par autoradiographie des transcrits amplifiés des chaînes β du TCR exprimé par les lymphocytes périphériques d'un individu sain, et du contrôle β-actine co-amplifié.

- La Fig. 9 représente l'analyse par cytofluorimétrie de la réactivité de l'anticorps monoclonal RO-73 respectivement vis-à-vis du clone immunisant 3025 (9A), du clone 12410 (9B) et des lymphocytes circulants (9C).

La réactivité-témoin des anticorps NKTa ou OKT_3 est donnée respectivement pour chaque type de cellule.

Le nombre de cellules comptées (échelle linéaire) est donné en fonction de l'intensité de la fluorescence (échelle logarithmique).

- La Fig. 10 représente l'analyse par cytofluorimétrie de la réactivité de l'anticorps monoclonal JU-74 (Fig. 10A, 10B, 10C : mêmes conditions que pour les Fig. 9A, 9B, 9C).

- La Fig. 11 représente l'analyse par cytofluorimétrie de la comodulation avec la molécule CD3 de la structure TCR du clone 3025 reconnue par l'anticorps monoclonal RO-73 respectivement en absence (Fig. 11A) ou en présence d'anticorps anti-CD3 (Fig. 11B).

La comodulation-témoin est donnée respectivement avec les anticorps monoclonaux NKTa, OKT3 et anti-CD2.

- La Fig. 12 représente l'analyse par cytofluo-rimétrie de la comodulation avec la molécule CD3 de la structure TCR du clone 3025 reconnue par l'anticorps monoclonal JU-73, respectivement en absence (Fig. 12A) ou en présence d'anticorps anti-CD3 (Fig. 12B).

- La Fig. 13 représente la détection par autoradiographie des transcrits amplifiés des chaînes α (Fig. 13A) et des chaînes β (Fig. 13B) du TCR exprimé par les cellules $RO\text{-}73^+$.

I - <u>Obtention de l'ADNc et amplification par PCR</u>

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 césium (Chirgwin (12)) ou selon la méthode en une seule étape par extraction avec de l'isothiocyanate de guanidinium, du phénol et du chloroforme (Chomczynski (13)).

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 Cβ constituée par la séquence 5'-TATCTGGAGTCA TTGAGGGCGGGC (SEQ ID N° 20). 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 $COCl_2$ 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. (14)) dans un volume final de 100 microlitres contenant 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-Cl pH 8.3, 1,5 mM de $MgCl_2$, 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'-GCATGCGCGCGGCC GCGGAGG-14C) (SEQ ID N° 21) décrite par Loh et al. (15) ainsi qu'une amorce B spécifique de la région Cβ (5'-TGTGGCCAGGCATGCCAGTGTGGCC) (SEQ ID N° 22).

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, $ZnCl_2$ 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 Cβ l'amorce 5'-GGTGTGGGAGAA TTCTGCTTCTGA (SEQ ID N° 23). Le mélange de réaction est ensuite précipité par l'éthanol et remis en suspension dans 60 µl H_2O.

II - Clonage et séquençage des ADNc

1/3 du produit de la seconde amplification est mis à 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 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 Cβ (5'-TCTGCTTCT GATGGCTCAA) (SEQ ID N° 24) marqué au ^{32} P. On extrait l'ADN plasmidique des colonies positives et on séquence sur les deux brins par le procédé par terminaison de chaîne didésoxy (Sanger et al. (16)) avec de la Sequenase 2,0 (United States Biochemicals, Cleveland, Etats-Unis) en suivant les recommandations du fournisseur.

Les séquences obtenues ont été comparées aux séquences publiées Vβ en utilisant la méthode développée par Lipman et Pearson (17). Les codons de départ présumés ont été identifiés en recherchant la présence de la séquence consensus Kozak pour les sites d'initiation des traductions dans les cellules eucaryotes (Kozak (18)). La présence de séquences leader hydrophobes du côté N-terminal a été décelée par analyse de l'hydrophobicité selon la méthode décrite par Kyte (19).

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 : Eco RI, BamH I ou Hind III. L'ADN (15 microgrammes) a été soumis à une électrophorèse sur agarose 0,7 % et a été transféré sur des membranes de Nylon comme décrit par Triebel et al. (20). 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, 0,2 % de SDS.

On a utilisé comme sondes Vβ spécifiques des sondes obtenues par amplification d'ADNc V-J-C en utilisant comme amorce l'amorce poly-C et l'amorce C. Les sondes ont été purifiées sur gel d'agarose 1 %. Des sondes d'ADN marquées au ^{32}P ont été préparées à partir des fragments purifiés sur agarose par la méthode de Feinberg (21).

IV - **Résultats**

En utilisant la méthode A-PCR, 350 ADNc qui hybrident avec la sonde Cβ ont été clonés, puis séquencés. Parmi ceux-ci, 226 ADNc correspondent à des régions variables V-J-Cβ uniques.

Les séquences Vβ de l'invention figurent dans la liste des séquences sous les SEQ ID N° 2 à 19. Les séquences SEQ ID N° 3 à 5 correspondent à 3 sous familles nouvelles tandis que les séquences SEQ ID N° 2 et 6 à 19 correspondent à de nouveaux membres de sous-familles Vβ connues ou à des extensions de segments Vβ connus.

Sous-famille Vβ w21 (SEQ ID N° 2)

Cette sous-famille a été identifiée par le clone IGR b02 (SEQ ID N° 2).

Cette séquence présente pour la partie codante une homologie d'environ 85 % avec la séquence HSTCRB23 (Wilson et al. (41)).

Sous-famille Vβ w22 (SEQ ID N° 3)

Le segment SEQ ID N° 3 a été défini comme séquence consensus à partir de 23 clones distincts d'ADNc. On a observé en position 322 un C au lieu d'un T et en position 350 un A au lieu d'un G.

Sous-famille Vβ w23 (SEQ ID N° 4)

Le segment ID N° 4 a été défini comme séquence consensus à partir de 4 clones distincts. On a observé en position 154 un G au lieu d'un A et en position 160 un A au lieu d'un G. Il présente une homologie de 75,7 % avec la séquence VB12A1 (Leiden déjà cité) mais présente une homologie inférieure à 75 % avec les autres membres de la sous-famille Vβ 5 (représentés sur la Fig. 1). Il ne fait donc pas partie de la sous-famille Vβ 5.

Sous-famille Vβ w24 (SEQ ID N° 5)

Le segment SEQ ID N° 5 a été défini à partir de 2 clones distincts d'ADNc.

Les analyses par Southern blot d'ADN de lignée germinale soumis à une digestion par les endonucléases, en utilisant des sondes V-J-Cβ comprenant des fragments Vβ correspondant aux sous-familles Vβ w21 à Vβ w24 ont été réalisées dans des conditions d'hybridation de "faible stringence" pour identifier le nombre de segments géniques Vβ appartenant à chaque famille et pour caractériser des fragments de restriction d'ADN portant ces segments géniques Vβ. Des résultats représentatifs sont reportés sur la Figure 7.

Ces analyses sont compatibles avec la présence dans les cellules érythroleucémiques K 562 d'au moins trois segments géniques pour la sous-famille V w21, deux pour la sous-famille Vβ w23 et un pour les sous-familles Vβ w22 et Vβ w24.

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

Vβ w21 : EcoR I 1,7-,3- et 6,5 kb, Hind III 2,5-, 7,2-, 11,7-, 14- et 18 kb, BamH I 5,5-, 16,5- et 23 kb;

Vβ w22 ; EcoR I 2,8 kb, Hind III 8,8 kb, BamH I 5,3 kb;
Vβ w23 : EcoR I 3,2- et 4,4 kb, Hind III 7,4-,15,5- et 16,5 kb, BamH I 2,5- et 5,7 kb ;
Vβ w24 : EcoR I 8 kb, Hind III 20 kb et 7,3 kb, BamH I 11,- et 22 kb.

Sous-famille Vβ 5 (Fig. 1) :

SEQ ID N° 6 et 7 (IGR b06 et IGR b07)

Ces séquences présentent une homologie respectivement de 79 à 86 % et de 76 à 70 % avec les 4 segments précédemment connus VB12A1 (Leiden déjà cité), HBP51 (Kimura (23)), PH24 (Tillinghast déjà cité) et PL25 (Concannon (24)) et représentent de nouveaux membres.

SEQ ID N° 8 et 9 (IGR b08 et IGR b09)

Ces séquences correspondent à des extensions du côté 5' des clones VB12A1 et PL25 respectivement. Pour SEQ ID N° 8 deux substitutions de nucléotides sont observées par rapport à VB12A1.

Sous-famille Vβ 6 (Fig. 2) :

SEQ ID N° 10 (IGR b11)

Cette séquence correspond à une extension du côté 5' du clone HBP25 (Kimura, déjà cité).

SEQ ID N° 11 (IGR b12)

Cette séquence qui représente un nouveau membre présente une homologie des nucléotides de 94 % avec PH 16 (Tillinghast, déjà cité), GPPA (Li, déjà cité) et HT45 (Kimura (25)).

Sous-famille Vβ 12 (Fig. 3) :

SEQ ID N° 12 (IGR b13)

Cette séquence qui représente un nouveau membre correspond à plus de 85 % d'homologie avec les séquences PH27 (Tillinghast, déjà cité) et PL42 (Concannon, déjà cité).

Sous-famille Vβ 13 (Fig. 4) :

SEQ ID N° 13, 14 et 15 (IGR b14, IGR b15 et IGR b16)

Les séquences SEQ ID N° 13 et 14 qui représentent de nouveaux membres présentent une homologie respectivement de 78 à 91 % et de 77 à 79 % avec les autres séquences connues HBVP34 (Kimura (23)) et CEM (Duby (26)).

La séquence SEQ ID N° 15 présente une homologie de 94 % avec HBVP34. Il est à noter que la séquence SEQ ID N° 15 présente un intron (représenté en caractères minuscules) dans la région leader. La séquence SEQ ID N° 15 est une séquence consensus. On a observé en position 231 un C au lieu d'un T et en position 259 un A au lieu d'un G.

Sous-famille Vβ 7 (Fig. 5) :

SEQ ID N° 16 et 17 (IGR b17 et IGR b18)

Ces séquences présentent une forte homologie avec la séquence PL4.19 tronquée (Concannon, déjà cité) et la prolongent du côté 5' jusqu'au signal de début de la traduction.

SEQ ID N° 18 (IGR b19)

Cette séquence prolonge la séquence PL4.9 (Concannon, déjà cité) du côté 5' jusqu'au signal de début de la traduction.

Sous-famille Vβ 9 (Fig. 6) :

SEQ ID N° 19 (IGR b20)

Cette séquence prolonge la séquence PL2.6 (Concannon, déjà cité) du côté 5'. On observe une différence entre les deux séquences aux positions 98 et 100 correspondant à des aminoacides différents.

La présente invention vise également à fournir des oligonucléotides spécifiques des différentes sous-familles Vβ, qui sont utilisables comme amorces pour l'amplification d'ADN

correspondant à ces différentes sous-familles Vβ, en vue par exemple d'une étude de l'expression de certaines sous-familles Vβ chez un patient et finalement d'un diagnostic des désordres inmmunitaires, comme indiqué plus haut.

L'expression prédominante de certaines sous-familles de Vβ a déjà été étudiée à l'aide d'une gamme incomplète d'oligonucléotides.

Ainsi, Sottini et al. (33) ont mis en évidence à l'aide d'une gamme d'oligonucléotides une expression prédominante de certains Vβ chez des patients atteints d'arthrite rhumatoïde.

De même, Choi Y. et al (32) ont mis en évidence à l'aide d'une gamme d'oligonucléotides la stimulation de lymphocytes T par des toxines de Staphylococcus aureus par l'intermédiaire de Vβ spécifiques.

La présente invention vise à fournir une gamme complète d'oligonucléotides permettant l'étude à la fois des sous-familles Vβ connues et des nouvelles sous- familles Vβ 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 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 β des récepteurs de cellules T, choisis parmi les séquences SEQ ID N° 25 à 48.

La présente invention a également pour objet l'utilisation, comme amorces pour l'amplification d'ADN correspondant à des régions variables de chaînes des récepteurs des cellules T, d'oligonucléotides choisis parmi les séquences SEQ ID N° 25 à 48.

La présente invention a également pour objet un procédé de détection de séquences nucléotidiques codant pour des segments Vβ 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 définis ci-dessus et un oligonucléotide appartenant au segment Cβ, et

b) la détection des séquences amplifiées avec une sonde Cβ.

L'oligonucléotide appartenant un segment Cβ utilisé pour l'amplification peut être notamment choisi parmi les séquences SEQ ID N° 49 et 50.

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 l'aide d'une sonde contrôle correspondante.

Cette paire d'amorces contrôle peut correspondre à deux segments Cα, par exemple les amorces CαE et CαJ correspondant aux séquences SEQ ID N° 55 et 56. On utilise alors une sonde de détection Cα (correspondant par exemple à la séquence SEQ ID N° 57). Mais cette paire d'amorces est avantageusement constituée par deux amorces appartenant à la β-actine, notamment celles correspondant aux séquences SEQ ID N° 52 et 53. On utilise alors une sonde de détection correspondant à une séquence de la β-actine, telle la séquence SEQ ID N° 54.

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° 25 à 48,

b) une amorce Cβ,

c) une sonde Cβ.

Un tel kit contient avantageusement en outre :

d) une paire d'amorces contrôle,

e) une sonde contrôle.

Ce kit peut notamment comprendre :

a) l'ensemble des 24 oligonucléotides correspondant aux séquences SEQ ID N° 25 à 48,

b) une amorce Cβ choisie parmi les séquences correspondant aux séquences SEQ ID 49 et 50,

c) une paire d'amorces contrôle pour la β-actine ayant une séquence correspondant respectivement aux séquences SEQ ID N° 52 et 53,

d) une sonde Cβ correspondant à la séquence SEQ ID N° 51,

e) une sonde contrôle pour la β-actine correspondant à la séquence SEQ ID N° 54.

Dans l'information donnée dans la liste des séquences pour les séquences 25 à 54, les séquences SEQ ID N° 25 à 45 correspondent à des séquences appartenant à des clones des sous-familles connues Vβ 1 à Vβ 20 (accessibles dans la base de données EMBL) ou à des séquences qui en diffèrent par un ou deux nucléotides. Les séquences SEQ ID N° 45, 46, 47 et 48 correspondent à des séquences appartenant à des clones de nouvelles sous-familles de l'invention, correspondent à des sous-familles dénommées provisoirement Vβ w21, Vβ w22, Vβ w23 et Vβ w24 (w indiquant que la désignation est dans l'attente d'une désignation définitive).

Les séquences SEQ ID N° 49 et 50 sont deux exemples d'oligonucléotides Cβ qui peuvent être utilisés comme amorces pour l'amplification.

La séquence SEQ ID N° 51 est la séquence d'une sonde Cβ qui peut être utilisée pour la détection des ADN amplifiés.

Enfin, les séquences SEQ ID N° 52, 53 et 54 sont respectivement les séquences d'une paire d'oligonucléotides appartenant à la séquence de la β-actine qui peuvent être utilisés pour le 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 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.

Les oligonucléotides ont été synthétisés sur un synthétiseur d'ADN automatisé Applied Biosystems 381 A en utilisant la méthode au β-cyanoéthylphosphoramidite (Sinha N. et al. (34)) 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 μ-bondapak C18 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 d'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) telle que décrite par Saiki et al. (14) 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 réverse transcriptase comme mentionné plus haut.

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 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 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 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, 13). L'ADN complémentaire a été synthétisé dans un volume final de 20 μl à 42° C durant 1 heure en utilisant 1 à 5 μg d'ARN total, la réverse transcriptase et l'amorce Cβ B (1,25 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 Vβ spécifiques correspondant aux séquences SEQ ID N° 25 à 48 et

l'amorce Cβ B spécifique de la région Cβ (SEQ ID N° 50). 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 M de dNTP, 0,25 unités de Taq polymérase et 0,25 M 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° 52 et 53) 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 CβC (SEQ ID N° 51) et Act 3 (SEQ ID N° 54) marquées au ^{32}P 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 obtenus sont indiqués sur la figure 8.

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 corespondants, chaque fragment ayant une longueur correspondant à la distance entre l'emplacement de l'oligonucléotide spécifique Vβ et l'amorce Cβ.

Chez l'individu testé, la Figure 8 met en évidence l'expression préférentielle de certains segments géniques définis par rapport à d'autres. Par exemple, les sous-familles Vβ 1 et 2 sont plus représentées que les autres

sous-familles.

Exemple de préparation d'anticorps monoclonaux anti Vβ13 : anticorps monoclonaux RO-73 et JU-74

1) Cellules immunisantes

Le clone T 3025 (Moebius et al. (35)) a été cultivé en milieu complet comprenant du DMEM (Seromed), 8 % de sérum humain AB, de l'IL-2 et du TCGF comme décrit par Hercend et al. (36). Des restimulations périodiques ont été effectuées sur cellules allogéniques en présence d'IL-2. Les ARN messagers codant pour le récepteur T exprimés par ces cellules ont été séquencés par la technique d'A-PCR et représentent des réarrangements des segments géniques Vα10 (séquence HAP58, Yoshikai et al. (37)) et Vβ13 (séquence IGRb16=SEQ ID N° 15 indiquée ci-dessus).

2) Immunisation des souris

Des souris Biozzi de 6 semaines (Institut Curie, Paris, France) ont été immunisées avec les cellules T entières du clone 3025. Après une première injection intrapéritonéale de 5 x 10^6 cellules en adjuvant complet de Freund, les souris ont reçu trois injections intrapérito-néales de 5 x 10^6 cellules en adjuvant incomplet de Freund à trois semaines d'intervalle. Deux semaines après la dernière injection intrapéritonéale, les souris ont reçu 2 x 10^6 cellules viables en injection intraveineuse. Les souris ont été sacrifiées trois jours plus tard et la rate a été prélevée.

3) Fusion

La fusion des cellules spléniques avec le myélome non secrétant NS-1 a été menée selon la méthode de Kohler et Milstein (38). Les cellules NS-1 (Kohler et Milstein (39)) ont été cultivées en milieu comprenant du DMEM (Seromed), de la 8-azaguanine (Sigma, Saint Louis, MI), 10 % de sérum de cheval (Seromed, lot n° 5Z04), de la pénicilline et de la streptomycine (Eurobio), de la glutamine (Seromed, 200 mM) et du pyruvate de sodium (Gibco, 100 mM).

Les spénocytes ont été fusionnés avec les cellules NS-1 par le polyéthylène-glycol (PEG 1000, Merck) avec un rapport de 4 cellules spléniques pour une cellule de myélome. Après la fusion, les cellules ont été cultivées à 3 x 10^6 cellules par ml en plaques de 96 puits (Nunc) dans un milieu de sélection HAT contenant du DMEM, 10 % de sérum de cheval, 10 % de sérum de veau foetal (Seromed, lot n° 219195), de l'aminoptérine (Gibco), de l'hypoxanthine et de la thymidine (Gibco), de la pénicilline et de la streptomycine, de la glutamine, du pyruvate de sodium et du NCTC 109 (Eurobio). Du milieu frais a été ajouté dans les puits 2 jours (50 µl par puits) et 9 jours après la fusion (100 µl par puits). La culture a été réalisée à 37° C, dans un incubateur contenant 10 % de CO_2.

4) Criblage des hybridomes

Le surnageant des hybridomes obtenus a été récolté 15 jours après la fusion et testé pour sa réacti-vité avec la cellule immunisante par immunofluorescence indirecte et analyse en cytométrie de flux. En bref, les cellules T3025 ont été incubées à 4° C pendant 30 minutes avec le surnageant d'hybridome (100 µl pour 300 000 cellules), lavées et marquées avec un anticorps de chèvre anti-immunoglobulines de souris conjugué à la fluoresceine (Coulter Electronics, Hialeah, FL). Les cellules ont ensuite été analysées par cytofluorométrie (Coulter Profile). Comme le montrent les figures 9A et 10A, les surnageants des hybridomes RO-73 et JU-74 permettent le marquage de 100 % des cellules du clone immunisant 3025. Un anticorps anti-CD3 (OKT3 Ortho-Co) et l'anticorps anti-clonotype NKTa (IgG1, Hercend et al. (40)) servaient respectivement de contrôles positif et négatif dans cette expérience.

5) Spécificité anti-récepteur T

La spécificité anti-récepteur T des anticorps monoclonaux a été analysée selon les critères suivants :

1 - les anticorps doivent reconnaître le clone T 3025 immunisant mais pas un clone T portant un récepteur des cellules T (TCR) différent, par exemple le clone 12410 (Moebius et al., (35), TCR exprimé : Vα3/Vβ17).

2 - Les anticorps doivent réagir avec un faible pourcentage de lymphocytes circulants (PBL).

3 - La structure de surface reconnue par les anticorps sur la cellule immunisante doit co-moduler avec la molécule CD3 lors de l'incubation des cellules en présence d'anticorps anti-CD3 (Meuer et al. (1)).

Comme le montrent les figures 9 et 10, les surnageants des hybridomes RO-73 et JU-74 réagissent avec 100 % des cellules du clone 3025 immunisant (Fig. 9A et 10A), moins de 2 % des cellules du clone 12410 (Fig. 9B et 10B) et 1 à 3 % des PBL (Fig. 9C et 10C).

Pour les expériences de co-modulation, les cellules du clone 3025 (10^6 cellules par ml) ont été incubées en milieu seul ou en présence d'anticorps anti-CD3 (OKT3) dans des plaques de culture de 24 puits. Après 24 heures d'incubation, les cellules ont été récoltées et marquées avec le surnageant d'hybridome RO-73 ou JU-74, l'anticorps monoclonal anti-CD3 ou un anticorps monoclonal contrôle anti-CD2 (Coultronics Co.) puis analysées par cytofluorimétrie. Comme le montrent les Figures 11 et 12, l'analyse par cytofluorimétrie des cellules incubées en présence d'anticorps monoclonal anti-CD3 (Fig. 11B et 12B) montre une diminution de l'intensité de fluorescence pour l'anticorps monoclonal anti-CD3 ainsi que pour RO-73 et JU-74, alors que l'intensité du marquage avec l'anticorps monoclonal anti-CD2 augmente par comparaison à l'intensité obtenue respectivement en absence d'anticorps anti-CD3 (Fig. 11A et Fig. 11B). Ces résultats indiquent que la molécule reconnue par les anticorps RO-73 et JU-74 co-module avec la molécule CD3 à la surface des cellules du clone T 3025.

6) Isolement d'un sous-clone

Les cellules des hybridomes initiaux, respectivement RO-73 et JU-74, ont été réparties en plaques de culture à raison de 0,5 cellule par puits en milieu HAT complet, sur des cellules spléniques syngéniques irradiées. 3 sous-clones ont été sélectionnés pour chacun des hybridomes RO-73 et JU-74. Ces cellules produisent des anticorps monoclonaux dont la réactivité est identique à celle des hybridomes initiaux

(résultats non montrés).

Les sous-clones ont été cultivés en milieu non sélectif contenant du DMEM, 10 % de sérum de veau foetal, 10 % de sérum de cheval, de l'hypoxanthine, de la thymidine, de la pénicilline et de la streptomycine, de la glutamine, du pyruvate de sodium et du NCTC 109.

Les cellules d'hybridomes ou de sous-clones ont été congelées dans du sérum de veau foetal contenant 10 % de diméthyl-sulfoxyde (DMSO, Merck) et conservées dans l'azote liquide.

7) Isotypage des anticorps monoclonaux

Les isotypes ont été déterminés par immunodiffusion sur support solide en utilisant un kit "INNO-LIA mouse mAb isotyping" (Innogenetics) pour la détermination des isotypes d'immunoglobulines dans les surnageants de culture. RO-73 et JU-74 sont des immunoglobulines de souris d'isotype IgG1, kappa.

8) Purification des anticorps monoclonaux

Des ascites ont été produites dans des souris nudes. Le liquide d'ascite obtenu a été filtré sur coton pour éliminer la fibrine et précipité par le sulfate de sodium (18 %). Le culot obtenu a été mis en suspension dans du tampon PBS, dilué 1/3 dans du tampon (NaCl 4,5 M, glycine 2,25 M, pH 8,8) et chargé sur une colonne de Protéine A-Sepharose 4 Fast Flow équilibrée dans le tampon de charge (NaCl 3M, glycine 1,5 M, pH 8,8). Un pic majoritaire d'immunoglobulines a été élué à pH 6 en utilisant des tampons d'élution successifs de pH décroissant. Ce pic majoritaire a été purifié sur colonne échangeuse d'ions (Q Sepharose Fast Flow) en tampon Tris 50 mM, pH 8 et élué par un gradient de NaCl.

La pureté de la préparation a été vérifiée par électrophorèse dans un système PHAST (Pharmacia LKB, Uppsala, Suède) et les immunoglobulines purifiées ont été testées en immunofluorescence indirecte sur la cellule 3025, comme indiqué précédemment.

A titre d'exemple, pour 30 ml d'ascite de l'hybridome RO-

73, on obtient après purification sur Proteine A et Q Sepharose Fast Flow, 32 mg d'immunoglobulines purifiées.

9) Pourcentage de PBL reconnus par les anticorps monoclonaux

Les pourcentages de lymphocytes circulants reconnus respectivement par les anticorps monoclonaux RO-73 et JU-74 ont été déterminés pour 10 donneurs sains différents. Les résultats sont montrés dans le Tableau 1. L'anticorps monoclonal JU-74 reconnaît moins de 0,5 % à 2,1 % des PBL (moyenne 1,08 %) et l'anticorps monoclonal RO-73 reconnaît de 0,5 % à 2,2 % des PBL selon les individus (moyenne 1,09 %). Pour un individu donné, les anticorps monoclonaux RO-73 et JU-74 reconnaissent respectivement environ les mêmes pourcentages de lymphocytes circulants.

TABLEAU 1

Réactivité des anticorps monoclonaux RO-73 et JU-74 avec les cellules du sang périphériques

Donneur	RO-73	JU-74
BQ	2,2	2,1
BY	0,9	1,1
BZ	<0,5	<0,5
CA	0,5	<0,5
CB	0,5	0,6
CD	1,8	1,7
CE	0,4	0,3
CH	1,6	1,3
CI	1,4	1,2
CJ	1,1	1,5

10) Purification des PBL reconnus par les anticorps monoclonaux

Les PBL reconnus respectivement par les anticorps monoclonaux RO-73 et JU-74 ont été purifiés à partir d'un donneur normal en utilisant un procédé de sélection positive par des billes magnétiques (Dynabeads, Dynal). En bref, 1 à 4 x 10^9 PBL ont été marqués par l'un ou l'autre des anticorps monoclonaux purifiés ci-dessus et incubés avec les billes Dynabeads M-450 prêtes à l'emploi recouvertes par un sérum de chèvre anti-IgG de souris, dans la proportion de 3 billes pour une cellule marquée. Les cellules positives ont ensuite été séparées grâce à un aimant. Après plusieurs lavages, les cellules ont été incubées avec un excès d'immunoglobulines de chèvre anti-IgG de souris ("Detach-a-beads", Dynatech) pour détacher les billes magnétiques puis directement analysées en cytométrie de flux après marquage par l'anticorps monoclonal RO-73 ou l'anticorps monoclonal JU-74, respectivement.

Les cellules positives sélectionnées ont été cultivées en microplaque en présence d'IL-2 sur des cellules allogéniques irradiées puis à nouveau purifiées par les billes magnétiques après environ une semaine de culture afin d'obtenir une préparation d'une pureté supérieure à 95 %.

Pour l'anticorps monoclonal JU-74, 8 x 10^6 cellules positives à 96 % de pureté ont été obtenues, après une culture d'une semaine, à partir de 1 x 10^9 PBL d'un donneur sain contenant initialement 1,7 % de cellules JU-74+.

Pour l'anticorps monoclonal RO-73, 9 x 10^6 cellules positives à 98 % de pureté ont été obtenues, après 10 jours de culture, à partir de 1,2 x 10^9 PBL d'un donneur sain contenant initialement 2,4 % de cellules RO-73+.

A partir des cellules RO-73+ et JU-74+ purifiées ainsi sélectionnées, des lignées cellulaires ont été respectivement établies; chaque lignée est reconnue à 100 % par les deux anticorps monoclonaux, ce qui montre que les deux anticorps monoclonaux reconnaissent les mêmes cellules dans le sang périphérique.

11) Analyse des transcrits du TCR exprimés dans les PBL reconnus par RO-73 et JU-74 par les techniques de PCR

a) Méthode d'analyse des transcrits β

La gamme des oligonucléotides spécifiques des segments Vβ de type Vβ1 à Vβ24 décrite ci-dessus (SEQ ID N° 25 à N° 48) a été utilisée comme amorces spécifiques pour analyser les transcrits β du TCR exprimés dans les cellules RO-73+ et JU-74+. La procédure employée est identique à celle décrite dans l'exemple ci-dessus pour les lymphocytes périphériques d'un individu sain. En bref, après préparation de l'ARN selon la méthode de Chomczynski (13), l'ADN complémentaire a été synthétisé en utilisant la réverse transcriptase et l'amorce Cβ B (SEQ ID N° 50). Le matériel obtenu a été soumis à 30 cycles d'amplification selon la technique PCR en utilisant en parallèle chacune des amorces Vβ spécifiques correspondant aux séquences SEQ ID N° 25 à 48 et l'amorce Cβ B spécifique de la région Cβ (SEQ ID N° 50) comme décrit précédemment.

Les produits amplifiés obtenus ont été séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 2 %, transférés sur des membranes de nylon et hybridés avec la sonde oligonucléotidique Cβ C (SEQ ID N° 51) marquée au ^{32}P. Les membranes ont ensuite été lavées comme décrit ci-dessus puis autoradiographiées.

Le séquençage des transcrits de la chaîne β des TCR a été réalisé en suivant la méthode de clonage et de séquençage décrite précédemment pour l'ADNc. Par exemple, le matériel amplifié par l'oligonucléotide spécifique de la sous-famille Vβ13 (SEQ ID N° 37) a été digéré par l'enzyme SacII et purifié par électrophorèse sur gel d'agarose. Le matériel obtenu a été introduit dans le vecteur pBS SK+ [comme décrit plus haut pour la technique d'A-PCR] et utilisé pour transfecter les bactéries E. Coli XL-1-blue. Les colonies transformées obtenues ont été testées par hybridation en dot-blot en utilisant la sonde oligonucléotidique Cβ C (SEQ ID N° 51) marquée au ^{32}P. L'ADN plasmidique a été séquencé comme décrit précédemment.

b) Méthode d'analyse des transcrits α

Une méthodologie semblable à celle décrite pour les

transcrits β a été appliquée à l'analyse des transcrits de la chaîne α du TCR en utilisant comme amorces spécifiques une gamme d'oligonucléotides spécifiques des segments Vα de type Vα1 à Vα29 et des oligonucléotides spécifiques de la région constante Cα (oligonucléotide Cα B pour la synthèse de l'ADN complémentaire et l'amplification par PCR et oligonucléotide Cα C pour la sonde de détection). Les séquences de ces oligonucléotides sont indiquées dans le Tableau 2.

TABLEAU 2

Sequence	Type
5'-GGCATTAACGGTTTTGAGGCTGGA-3'	Vα1
5'-CAGTGTTCCAGAGGGAGCCATTGC-3'	Vα2
5'-CCGGGCAGCAGACACTGCTTCTTA-3'	Vα3
5'-TTGGTATCGACAGCTTCCCTCCCA-3'	Vα4
5'-CGGCCACCCTGACCTGCAACTATA-3'	Vα5
5'-TCCGCCAACCTTGTCATCTCCGCT-3'	Vα6
5'-GCAACATGCTGGCGGAGCACCCAC-3'	Vα7
5'-CATTCGTTCAAATGTGGGCAAAAG-3'	Vα8
5'-CCAGTACTCCAGACAACGCCTGCA-3'	Vα9
5'-CACTGCGGCCCAGCCTGGTGATAC-3'	Vα10
5'-CGCTGCTCATCCTCCAGGTGCGGG-3'	Vα11
5'-TCGTCGGAACTCTTTTGATGAGCA-3'	Vα12
5'-TTCATCAAAACCCTTGGGGACAGC-3'	Vα13
5'-CCCAGCAGGCAGATGATTCTCGTT-3'	Vα14
5'-TTGCAGACACCGAGACTGGGGACT-3'	Vα15
5'-TCAACGTTGCTGAAGGGAATCCTC-3'	Vα16
5'-TGGGAAAGGCCGTGCATTATTGAT-3'	Vα17
5'-CAGCACCAATTTCACCTGCAGCTT-3'	Vα18
5'-ACACTGGCTGCAACAGCATCCAGG-3'	Vα19

TABLEAU 2 (suite)

Sequence	Type
5'-TCCCTGTTTATCCCTGCCGACAGA-3'	Vα20
5'-AGCAAAATTCACCATCCCTGAGCG-3'	Vα21
5'-CCTGAAAGCCACGAAGGCTGATGA-3'	Vα22
5'-TGCCTCGCTGGATAAATCATCAGG-3'	Vαw23
5'-CTGGATGCAGACACAAAGCAGAGC-3'	Vαw24
5'-TGGCTACGGTACAAGCCGGACCCT-3'	Vαw25
5'-AGCGCAGCCATGCAGGCATGTACC-3'	Vαw26
5'-AAGCCCGTCTCAGCACCCTCCACA-3'	Vαw27
5'-TGGTTGTGCACGAGCGAGACACTG-3'	Vαw28
5'-GAAGGGTGGAGAACAGATGCGTCG-3'	Vαw29
5'-ATACACATCAGAATTCTTACTTTG-3'	CαA
5'-GTTGCTCCAGGCCGCGGCACTGTT-3'	CαB
5'-GTCACTGGATTTAGAGTCT-3'	CαC

c) Résultats

La Figure 13 montre les résultats obtenus pour l'analyse des transcrits des chaînes α (Fig. 13 A) et des chaînes β (Fig. 13B) du TCR exprimés par les cellules RO-73+ reconnues par l'anticorps monoclonal RO-73. On constate que de nombreux segments Vα différents sont exprimés dans ces cellules (Figure 13A). Par contre, seul l'oligonucléotide spécifique des séquences de la sous-famille Vβ13 permet une amplification de l'ADNc (Figure 13B).

Des résultats identiques ont été obtenus pour les transcrits β du TCR exprimés dans les cellules JU-74+ reconnues par l'anticorps monoclonal JU-74 (résultats non montrés).

De plus, les transcrits β qui correspondent à la sous-famille Vβ13 exprimés par les cellules JU-74+ ont été séquencés à partir des cellules isolées précédemment afin de déterminer, parmi les 5 membres connus ou nouveaux de la sous-famille Vβ13 (Figure 4), ceux dont les produits sont reconnus par l'anticorps monoclonal JU-74. Le tableau 3 montre les résultats obtenus après analyse de ces séquences. Les huit séquences différentes de Vβ13 obtenues correspondent toutes à un réarrangement du segment génique nouveau Vβ13 IGRb16 (SEQ ID N° 15) avec des segments J et des régions N différents.

TABLEAU 3

Expression des transcrits de la chaîne β dans les cellules JU-74+

ADNc clones	Vβ	membre	Jβ	Region N
B001	13	IGRb16I	J2.1	∓
B002	13	IGRb16I	J1.6	∓
B006	13	IGRb16I	J1.1	∓
B007	13	IGRb16I	J2.1	∓
B009	13	IGRb16I	J1.6	∓
B010	13	IGRb16I	J2.6	∓
B011	13	IGRb16I	J1.3	∓
B012	13	IGRb16I	J1.2	∓

L'ensemble de ces résultats montre que les anticorps monoclonaux RO-73 et JU-74 sont spécifiques des produits de segments géniques appartenant à la sous-famille Vβ13.

Plus précisément, les anticorps monoclonaux JU-74 et RO-73 ont la même spécificité et reconnaissent exclusivement le produit du segment génique nouveau Vβ13 IGRb16 de l'invention (SEQ ID N° 15 indiquée ci-dessus).

Les lignées cellulaires hybridomes suivantes ont été déposées auprès de la Collection Nationale de Culture de Microorganismes (CNCM - Institut Pasteur) : JU-74 et RO-73 le 12 février 1992 sous les numéros I-1173 et I-1172 .

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.
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. Wilson, R.K., et al., Immunological Reviews 1988c. 101:149.
8. Robinson, M.A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989. 86:9422.
9. Leiden, J.M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1986. 83:4456.
10. Reynolds 1986.
11. Li, Y., et al., J. Exp. Med. 1990. 171:221.
12. Chirgwin, J.M., et al., Biochemistry 1979. 18:5294
13. Chomczynski et al., Anal. Biochem., 1987, 162, 156.
14. Saiki, R.K., et al., Science 1988. 239:487.
15. Loh, E.Y., et al., Science 1989. 243:217.
16. Sanger, F., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1977. 74:5463.
17. Lipman, D.J., et al., Science 1985. 227:1435.
18. Kozak, M., Nucl. Acids Res. 1984. 12:857.
19. Kyte, J., et al., R.F., J. Mol. Biol. 1982. 157:105.
20. Triebel, F., et al., J. Immun. 1988. 140:300.
21. Feinberg, A.P., et al., Anal. Biochem. 1983. 132:6.
22. Tillinghast, J.P., et al., Science 1986. 248:879.
23. Kimura, N., et al., J. Exp. Med. 1986. 164:739.
24. Concannon, P., et al., Proc.
25. Kimura, N., et al., Eur. J. Immunol. 1987. 17:375
26. Duby, A.D., et al., proc. natl. Acad. Sc. USA 1986. 83:4890.
27. Naudenbark A., et al., Nature, 341, 541.
28. Janeway C., Nature, 341, 482.
29. Lin Y., J. Exp. Med., 171, 221.
30. Acha-Orbea H., EMBO, 1990, 9,12, 3815.
31. Kappler J., Science, 244, 811.
32. Choi Y., PNAS, 86, 8941.

33. Sottini A. et al., Eur. J. Immunol., 1991, 21, 461.

34. Sinha N. et al., Nucleic. Acids Res. 1984, 12, 4539.

35. Moebius, U. et al., Eur. J. immunol. 1990, 20, 889.

36. Hercend, T. et al., Cellular Immunol., 1984, 86, 381.

37. Yoshikai, Y. et al., J. Exp. med., 1986, 164, 90.

38. Kohler, G. et Milstein, C., Nature, 1975, 256, 495.

39. Kohler, G. et Milstein, C., Eur. J. immunol., 1976, 6, 511.

40. Hercend, T. et al., J. Exp. Med., 158, 1983, 1547.

41. Wilson, R.K. et al., Immunogenetics, 1990, 32, 406.

LISTE DES SEQUENCES

I - INFORMATION GENERALE

(1) DEMANDEUR : Société dite ROUSSEL UCLAF

(2) TITRE DE L'INVENTION :

Séquences nucléotidiques codant pour des régions variables des chaînes β des récepteurs des lymphocytes T humains, segments peptidiques correspondants et les applications diagnostiques et thérapeutiques.

(3) NOMBRE DE SEQUENCES : 56

III - INFORMATION POUR SEQ ID N° 2

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

TYPE : nucléotide et sa protéine correspondante

LONGUEUR : 387 paires de bases

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : ADNc pour ARNm

ORIGINE

ORGANISME : humain

LIGNEE CELLULAIRE : lymphocytes T humains

CARACTERISTIQUES

NOM DE L'ADN : IGR b 02

SEQUENCE Vβ w21

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE

```
                AGTGACCCTG ATCTGGCAAA GCTTCCATCC TGCCCTGACC CTGCC ATG    48
                                                                  MET
                                                                  1

GGT ACC AGG CTC CTC TGC CGG GTG GCC TTC TGT CTC CTG GTG GAA GAA    96
Gly Thr Arg Leu Leu Cys Arg Val Ala Phe Cys Leu Leu Val Glu Glu
            5                   10                  15

CTC ATA GAA GCT GGA GTG GTT CAG TCT CCC AGA TAT AAG ATT ATA GAG   144
Leu Ile Glu Ala Gly Val Val Gln Ser Pro Arg Tyr Lys Ile Ile Glu
        20                  25                  30

AAA AAG CAG CCT GTG GCT TTT TGG TGC AAT CCT ATT TCT GGC CAC AAT   192
Lys Lys Gln Pro Val Ala Phe Trp Cys Asn Pro Ile Ser Gly His Asn
    35                  40                  45

ACC CTT TAC TGG TAC CGG CAG AAC TTG GGA CAG GGC CCG GAG CTT CTG   240
Thr Leu Tyr Trp Tyr Arg Gln Asn Leu Gly Gln Gly Pro Glu Leu Leu
50                  55                  60                  65

ATT CGA TAT GAG AAT GAG GAA GCA GTA GAC GAT TCA CAG TTG CCT AAG   288
Ile Arg Tyr Glu Asn Glu Glu Ala Val Asp Asp Ser Gln Leu Pro Lys
                70                  75                  80

GAT CGA TTT TCT GCA GAG AGG CTC AAA GGA GTA GAC TCC ACT CTC AAG   336
Asp Arg Phe Ser Ala Glu Arg Leu Lys Gly Val Asp Ser Thr Leu Lys
            85                  90                  95

ATC CAG CCT GCA GAG CTT GGG GAC TCG GCC GTG TAT CTC TGT GCC AGC   384
Ile Gln Pro Ala Glu Leu Gly Asp Ser Ala Val Tyr Leu Cys Ala Ser
        100                 105                 110

AGC                                                               387
Ser
```

IV - INFORMATION POUR SEQ ID N° 3

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

TYPE : nucléotide et sa protéine correspondante

LONGUEUR : 395 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 b 03

SEQUENCE Vβ w22

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE

```
                ACAGGACCAG ATGCCTGAGC TAGGAAAGGC CTCATTCCTG CTGTGATC    48

  CTGCC ATG GAT ACC TGG CTC GTA TGC TGG GCA ATT TTT AGT CTC TTG      95
        Met Asp Thr Trp Leu Val Cys Trp Ala Ile Phe Ser Leu Leu
        1               5                  10

AAA GCA GGA CTC ACA GAA CCT GAA GTC ACC CAG ACT CCC AGC CAT CAG    143
Lys Ala Gly Leu Thr Glu Pro Glu Val Thr Gln Thr Pro Ser His Gln
15                  20                  25                  30

GTC ACA CAG ATG GGA CAG GAA GTG ATC TTG CGC TGT GTC CCC ATC TCT    191
Val Thr Gln Met Gly Gln Glu Val Ile Leu Arg Cys Val Pro Ile Ser
                35                  40                  45

AAT CAC TTA TAC TTC TAT TGG TAC AGA CAA ATC TTG GGG CAG AAA GTC    239
Asn His Leu Tyr Phe Tyr Trp Tyr Arg Gln Ile Leu Gly Gln Lys Val
            50                  55                  60

GAG TTT CTG GTT TCC TTT TAT AAT AAT GAA ATC TCA GAG AAG TCT GAA    287
Glu Phe Leu Val Ser Phe Tyr Asn Asn Glu Ile Ser Glu Lys Ser Glu
        65                  70                  75

ATA TTC GAT GAT CAA TTC TCA GTT GAA AGG CCT GAT GGA TCA AAT TTC    335
Ile Phe Asp Asp Gln Phe Ser Val Glu Arg Pro Asp Gly Ser Asn Phe
    80                  85                  90

ACT CTG AAG ATC CGG TCC ACA AAG CTG GAG GAC TCA GCC ATG TAC TTC    383
Thr Leu Lys Ile Arg Ser Thr Lys Leu Glu Asp Ser Ala Met Tyr Phe
95                  100                 105                 110

TGT GCC AGC AGT                                                    395
Cys Ala Ser Ser
```

V - INFORMATION POUR SEQ ID N° 4

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

TYPE : nucléotide et sa protéine correspondante

LONGUEUR : 329 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 b 04

SEQUENCE Vβ w23

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE

```
                AGCTCCTCTG CCATGTC ATG CTT TGT CTC CTG GGA GCA GGT TCA GTG     47
                                   Met Leu Cys Leu Leu Gly Ala Gly Ser Val
                                   1               5                  10

GCT GCT GGA GTC ATC CAG TCC CCA AGA CAT CTG ATC AAA GAA AAG AGG     95
Ala Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro Arg His Leu Ile Lys Glu Lys Arg
               15                  20                  25

GAA ACA GCC ACT CTG AAA TGC TAT CCT ATC CCT AGA CAC GAC ACT GTC    143
Glu Thr Ala Thr Leu Lys Cys Tyr Pro Ile Pro Arg His Asp Thr Val
           30                  35                  40

TAC TGG TAC CAG CAG GGT CCA GGT CAG GAC CCC CAG TTC CTC ATT TCG    191
Tyr Trp Tyr Gln Gln Gly Pro Gly Gln Asp Pro Gln Phe Leu Ile Ser
       45                  50                  55

TTT TAT GAA AAG ATG CAG AGC GAT AAA GGA AGC ATC CCT GAT CGA TTC    239
Phe Tyr Glu Lys Met Gln Ser Asp Lys Gly Ser Ile Pro Asp Arg Phe
   60                  65                  70

TCA GCT CAA CAG TTC AGT GAC TAT CAT TCT GAA CTG AAC ATG AGC TCC    287
Ser Ala Gln Gln Phe Ser Asp Tyr His Ser Glu Leu Asn Met Ser Ser
75                 80                  85                  90

TTG GAG CTG GGG GAC TCA GCC CTG TAC TTC TGT GCC AGC AGC            329
Leu Glu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Ser Ser
               95                  100
```

VI - INFORMATION POUR SEQ ID N° 5

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

TYPE : nucléotide et sa protéine correspondante

LONGUEUR : 366 paires de bases

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : ADNc pour ARNm

ORIGINE

ORGANISME : humain

LIGNEE CELLULAIRE : lymphocytes T humains

CARACTERISTIQUES

NOM DE L'ADN : IGR b 05

SEQUENCE Vβ w24

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE

```
                ATTCCTGTAT GGGGTGGTAT TCCTGCC ATG GGT CCT GGG CTT CTC CAC     48
                                              Met Gly Pro Gly Leu Leu His
                                              1               5

TGG ATG GCC CTT TGT CTC CTT GGA ACA GGT CAT GGG GAT GCC ATG GTC              96
Trp Met Ala Leu Cys Leu Leu Gly Thr Gly His Gly Asp Ala Met Val
        10                  15                  20

ATC CAG AAC CCA AGA TAC CAG GTT ACC CAG TTT GGA AAG CCA GTG ACC             144
Ile Gln Asn Pro Arg Tyr Gln Val Thr Gln Phe Gly Lys Pro Val Thr
    25                  30                  35

CTG AGT TGT TCT CAG ACT TTG AAC CAT AAC GTC ATG TAC TGG TAC CAG             192
Leu Ser Cys Ser Gln Thr Leu Asn His Asn Val Met Tyr Trp Tyr Gln
40                  45                  50                  55

CAG AAG TCA AGT CAG GCC CCA AAG CTG CTG TTC CAC TAC TAT GAC AAA             240
Gln Lys Ser Ser Gln Ala Pro Lys Leu Leu Phe His Tyr Tyr Asp Lys
                60                  65                  70

GAT TTT AAC AAT GAA GCA GAC ACC CCT GAT AAC TTC CAA TCC AGG AGG             288
Asp Phe Asn Asn Glu Ala Asp Thr Pro Asp Asn Phe Gln Ser Arg Arg
            75                  80                  85

CCG AAC ACT TCT TTC TGC TTT CTT GAC ATC CGC TCA CCA GGC CTG GGG             336
Pro Asn Thr Ser Phe Cys Phe Leu Asp Ile Arg Ser Pro Gly Leu Gly
        90                  95                  100

GAC GCA GCC ATG TAC CTG TGT GCC ACC AGC                                     366
Asp Ala Ala Met Tyr Leu Cys Ala Thr Ser
    105                 110
```

VII - INFORMATION POUR SEQ ID N° 6

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

TYPE : nucléotide et sa protéine correspondante

LONGUEUR : 238 paires de bases

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : ADNc pour ARNm

ORIGINE

ORGANISME : humain

LIGNEE CELLULAIRE : lymphocytes T humains

CARACTERISTIQUES

NOM DE L'ADN : IGR b 06

SEQUENCE Vβ 5

```
A GGA CAG CAA GCG ACT CTG AGA TGC TCT CCT ATC TCT GGG CAC ACC   46
  Gly Gln Gln Ala Thr Leu Arg Cys Ser Pro Ile Ser Gly His Thr
  1               5                  10                  15

AGT GTG TAC TGG TAC CAA CAG GCC CTG GGT CTG GGC CTC CAG CTC CTC   94
Ser Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Ala Leu Gly Leu Gly Leu Gln Leu Leu
                20                  25                  30

CTT TGG TAT GAC GAG GGT GAA GAG AGA AAC AGA GGA AAC TTC CCT CCT  142
Leu Trp Tyr Asp Glu Gly Glu Glu Arg Asn Arg Gly Asn Phe Pro Pro
            35                  40                  45

AGA TTT TCA GGT CGC CAG TTC CCT AAT TAT AGC TCT GAG CTG AAT GTG  190
Arg Phe Ser Gly Arg Gln Phe Pro Asn Tyr Ser Ser Glu Leu Asn Val
        50                  55                  60

AAC GCC TTG GAG CTG GAG GAC TCG GCC CTG TAT CTC TGT GCC AGC AGC  238
Asn Ala Leu Glu Leu Glu Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser Ser
    65                  65                  70
```

VIII - INFORMATION POUR SEQ ID N° 7

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

TYPE : nucléotide et sa protéine correspondante

LONGUEUR : 192 paires de bases

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : ADNc pour ARNm

ORIGINE

ORGANISME : humain

LIGNEE CELLULAIRE : lymphocytes T humains

CARACTERISTIQUES

NOM DE L'ADN : IGR b 07

SEQUENCE Vβ 5

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE

```
ACT GTG TCC TGG TAC CAA CAG GCC CTG GGT CAG GGG CCC CAG TTT ATC    48
Thr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Ala Leu Gly Gln Gly Pro Gln Phe Ile
1               5                  10                  15

TTT CAG TAT TAT AGG GAG GAA GAG AAT GGC AGA GGA AAC TCC CCT CCT    96
Phe Gln Tyr Tyr Arg Glu Glu Glu Asn Gly Arg Gly Asn Ser Pro Pro
            20                  25                  30

AGA TTC TCA GGT CTC CAG TTC CCT AAT TAT AGC TCT GAG CTG AAT GTG   144
Arg Phe Ser Gly Leu Gln Phe Pro Asn Tyr Ser Ser Glu Leu Asn Val
        35                  40                  45

AAC GCC TTG GAG CTG GAC GAC TCG GCC CTG TAT CTC TGT GCC AGC AGC   192
Asn Ala Leu Glu Leu Asp Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser Ser
    50                  55                  60
```

IX - INFORMATION POUR SEQ ID N° 8

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

TYPE : nucléotide et sa protéine correspondante

LONGUEUR : 371 paires de bases

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : ADNc pour ARNm

ORIGINE

ORGANISME : humain

LIGNEE CELLULAIRE : lymphocytes T humains

CARACTERISTIQUES

NOM DE L'ADN : IGR b 08

SEQUENCE Vβ 5

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE

```
                GAACTCACTG GGTTCTTCCC CAGGAGGACC AAGCCCTGAA TCAGGTGCAG      50

                TGCTGCCTGC CCCACTGTGC C ATG GGC CCT GGG CTC CTC TGC TGG      95
                                        Met Gly Pro Gly Leu Leu Cys Trp
                                        1               5

GTG CTG CTT TGT CTC CTG GGA GCA GGC CCA GTG GAC GCT GGA GTC ACC     143
Val Leu Leu Cys Leu Leu Gly Ala Gly Pro Val Asp Ala Gly Val Thr
    10                  15                  20

CAA AGT CCC ACA CAC CTG ATC AAA ACG AGA GGA CAG CAA GTG ACT CTG     191
Gln Ser Pro Thr His Leu Ile Lys Thr Arg Gly Gln Gln Val Thr Leu
25                  30                  35                  40

AGA TGC TCT CCT ATC TCT GAG CAC AAG AGT GTG TCC TGG TAC CAA CAG     239
Arg Cys Ser Pro Ile Ser Glu His Lys Ser Val Ser Trp Tyr Gln Gln
                45                  50                  55

GTC CTG GGT CAG GGG CCC CAG TTT ATC TTT CAG TAT TAT GAG AAA GAA     287
Val Leu Gly Gln Gly Pro Gln Phe Ile Phe Gln Tyr Tyr Glu Lys Glu
            60                  65                  70

GAG AGA GGA AGA GGA AAC TTC CCT GAT CGA TTC TCA GCT CGC CAG TTC     335
Glu Arg Gly Arg Gly Asn Phe Pro Asp Arg Phe Ser Ala Arg Gln Phe
        75                  80                  85

CCT AAC TAT AGC TCT GAG CTG AAT GTG AAC GCC TTG TTG CTG GGG GAC     383
Pro Asn Tyr Ser Ser Glu Leu Asn Val Asn Ala Leu Leu Leu Gly Asp
    90                  95                  100

TCG GCC CTG TAT CTC TGT GCC AGC AGC                                 410
Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser Ser
105                 110
```

X - INFORMATION POUR SEQ ID N° 9

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

TYPE : nucléotide et sa protéine correspondante

LONGUEUR : 380 paires de bases

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : ADNc pour ARNm

ORIGINE

ORGANISME : humain

LIGNEE CELLULAIRE : lymphocytes T humains

CARACTERISTIQUES

NOM DE L'ADN : IGR b 09

SEQUENCE Vβ 5

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE

```
                AAGCCCTGAA TCAGATGCAG TGCTTCCTGTC CCTCTGTGCC ATG GGC      47
                                                            Met Gly
                                                             1

CCC GGG CTC CTC TGC TGG GCA CTG CTT TGT CTC CTG GGA GCA GGC TTA      95
Pro Gly Leu Leu Cys Trp Ala Leu Leu Cys Leu Leu Gly Ala Gly Leu
            5                  10                  15

GTG GAC GCT GGA GTC ACC CAA AGT CCC ACA CAC CTG ATC AAA ACG AGA     143
Val Asp Ala Gly Val Thr Gln Ser Pro Thr His Leu Ile Lys Thr Arg
        20                  25                  30

GGA CAG CAA GTG ACT CTG AGA TGC TCT CCT AAG TCT GGG CAT GAC ACT     191
Gly Gln Gln Val Thr Leu Arg Cys Ser Pro Lys Ser Gly His Asp Thr
    35                  40                  45

GTG TCC TGG TAC CAA CAG GCC CTG GGT CAG GGG CCC CAG TTT ATC TTT     239
Val Ser Trp Tyr Gln Gln Ala Leu Gly Gln Gly Pro Gln Phe Ile Phe
50                  55                  60                  65

CAG TAT TAT GAG GAG GAA GAG AGA CAG AGA GGC AAC TTC CCT GAT CGA     287
Gln Tyr Tyr Glu Glu Glu Glu Arg Gln Arg Gly Asn Phe Pro Asp Arg
                70                  75                  80

TTC TCA GGT CAC CAG TTC CCT AAC TAT AGC TCT GAG CTG AAT GTG AAC     335
Phe Ser Gly His Gln Phe Pro Asn Tyr Ser Ser Glu Leu Asn Val Asn
            85                  90                  95

GCC TTG TTG CTG GGG GAC TCG GCC CTC TAT CTC TGT GCC AGC AGC        380
Ala Leu Leu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser Ser
        100                 105                 110
```

XI - INFORMATION POUR SEQ ID N° 10

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

TYPE : nucléotide et sa protéine correspondante

LONGUEUR : 351 paires de bases

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : ADNc pour ARNm

ORIGINE

ORGANISME : humain

LIGNEE CELLULAIRE : lymphocytes T humains

CARACTERISTIQUES

NOM DE L'ADN : IGR b 11

SEQUENCE Vβ 6

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE

```
     GACCCTGCC ATG GGC ACC AGT CTC CTA TGC TGG GTG GTC CTG GGT TTC      48
               Met Gly Thr Ser Leu Leu Cys Trp Val Val Leu Gly Phe
               1               5                   10

CTA GGG ACA GAT CAC ACA GGT GCT GGA GTC TCC CAG TCT CCC AGG TAC      96
Leu Gly Thr Asp His Thr Gly Ala Gly Val Ser Gln Ser Pro Arg Tyr
    15                  20                  25

AAA GTC ACA AAG AGG GGA CAG GAT GTA GCT CTC AGG TGT GAT CCA ATC     144
Gln Val Thr Lys Arg Gly Gln Asp Val Ala Leu Arg Cys Asp Pro Ile
30                  35                  40                  45

TCG GGT CAT GTA TCC CTT TAT TGG TAC CGA CAG GCC CTG GGG CAG GGC     192
Ser Gly His Val Ser Leu Tyr Trp Tyr Arg Gln Ala Leu Gly Gln Gly
                50                  55                  60

CCA GAG TTT CTG ACT TAC TTC AAT TAT GAA GCC CAA CAA GAC AAA TCA     240
Pro Glu Phe Leu Thr Tyr Phe Asn Tyr Glu Ala Gln Gln Asp Lys Ser
            65                  70                  75

GGG CTG CCC AAT GAT CGG TTC TCT GCA GAG AGG CCT GAG GGA TCC ATC     288
Gly Leu Pro Asn Asp Arg Phe Ser Ala Glu Arg Pro Glu Gly Ser Ile
        80                  85                  90

TCC ACT CTG ACG ATC CAG CGC ACA GAG CAG CGG GAC TCG GCC ATG TAT     336
Ser Thr Leu Thr Ile Gln Arg Thr Glu Gln Arg Asp Ser Ala Met Tyr
    95                  100                 105

CGC TGT GCC AGC AGC                                                 351
Arg Cys Ala Ser Ser
110
```

XII - INFORMATION POUR SEQ ID N° 11

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

TYPE : nucléotide et sa protéine correspondante

LONGUEUR : 238 paires de bases

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : ADNc pour ARNm

ORIGINE

ORGANISME : humain

LIGNEE CELLULAIRE : lymphocytes T humains

CARACTERISTIQUES

NOM DE L'ADN : IGR b 12

SEQUENCE Vβ 6

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE

```
A AAG GAT GTA GAG CTC AGG TGT GAT CCA ATT TCA GGT CAT ACT GCC    46
  Lys Asp Val Glu Leu Arg Cys Asp Pro Ile Ser Gly His Thr Ala
  1               5                  10                  15

CTT TAC TGG TAC CGA CAG AGC CTG GGG CAG GGC CTG GAG TTT TTA ATT    94
Leu Tyr Trp Tyr Arg Gln Ser Leu Gly Gln Gly Leu Glu Phe Leu Ile
                20                  25                  30

TAC TTC CAA GGC AAC AGT GCA CCA GAC AAA TCA GGG CTG CCC AAC GAT   142
Tyr Phe Gln Gly Asn Ser Ala Pro Asp Lys Ser Gly Leu Pro Asn Asp
            35                  40                  45

CGG TTC TTT GCA GTC AGG CCT GAG GGA TCC GTC TCT ACT CTG AGG ATC   190
Arg Phe Phe Ala Val Arg Pro Glu Gly Ser Val Ser Thr Leu Arg Ile
        50                  55                  60

CAG CGC ACA GAG CGG GGG GAC TCA GCC GTG TAT CTC TGT GCC AGC AGC   238
Gln Arg Thr Glu Arg Gly Asp Ser Ala Val Tyr Leu Cys Ala Ser Ser
    65                  70                  75
```

XIII - INFORMATION POUR SEQ ID N° 12

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

TYPE : nucléotide et sa protéine correspondante

LONGUEUR : 294 paires de bases

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : ADNc pour ARNm

ORIGINE

ORGANISME : humain

LIGNEE CELLULAIRE : lymphocytes T humains

CARACTERISTIQUES

NOM DE L'ADN : IGR b 13

SEQUENCE Vβ 12

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE

```
TCA GGA CAC AGG GAT GCT GAA ATC ACC CAG AGC CCA AGA CAC AAG ATC    48
Ser Gly His Arg Asp Ala Glu Ile Thr Gln Ser Pro Arg His Lys Ile
1               5                  10                  15

ACA GAG ACA GGA AGG CAG GTG ACC TTG GCG TGT CAC CAG ACT TGG AAC    96
Thr Glu Thr Gly Arg Gln Val Thr Leu Ala Cys His Gln Thr Trp Asn
            20                  25                  30

CAC AAC AAT ATG TTC TGG TAT CGA CAA GAC CTG GGA CAT GGG CTG AGG   144
His Asn Asn Met Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Leu Gly His Gly Leu Arg
        35                  40                  45

CTG ATC CAT TAC TCA TAT GGT GTT CAA GAC ACT AAC AAA GGA GAA GTC   192
Leu Ile His Tyr Ser Tyr Gly Val Gln Asp Thr Asn Lys Gly Glu Val
    50                  55                  60

TCA GAT GGC TAC AGT GTC TCT AGA TCA AAC ACA GAG GAC CTC CCC CTC   240
Ser Asp Gly Tyr Ser Val Ser Arg Ser Asn Thr Glu Asp Leu Pro Leu
65                  70                  75                  80

ACT CTG GAG TCT GCT GCC TCC TCC CAG ACA TCT GTA TAT TTC TGC GCC   288
Thr Leu Glu Ser Ala Ala Ser Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala
                85                  90                  95

AGC AGT                                                          294
Ser Ser
```

XIV - INFORMATION POUR SEQ ID N° 13

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

TYPE : nucléotide et sa protéine correspondante

LONGUEUR : 369 paires de bases

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : ADNc pour ARNm

ORIGINE

ORGANISME : humain

LIGNEE CELLULAIRE : lymphocytes T humains

CARACTERISTIQUES

NOM DE L'ADN : IGR b 14

SEQUENCE Vβ 13

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE

```
AGAAGACCCC TCCATCCTGT AGCACCTGCC ATG AGC ATC GGG CTC CTG    48
                                 Met Ser Ile Gly Leu Leu
                                 1               5

TGC TGT GTG GCC TTT TCT CTC CTG TGG GCA AGT CCA GTG AAT GCT GGT    96
Cys Cys Val Ala Phe Ser Leu Leu Trp Ala Ser Pro Val Asn Ala Gly
            10                  15                  20

GTC ACT CAG ACC CCA AAA TTC CAG GTC CTG AAG ACA GGA CAG AGC ATG   144
Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Gln Val Leu Lys Thr Gly Gln Ser Met
        25                  30                  35

ACA CTG CAG TGT GCC CAG GAT ATG AAC CAT AAC TCC ATG TAC TGG TAT   192
Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His Asn Ser Met Tyr Trp Tyr
    40                  45                  50

CGA CAA GAC CCA GGC ATG GGA CTG AGG CTG ATT TAT TAC TCA GCT TCT   240
Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Tyr Ser Ala Ser
55                  60                  65                  70

GAG GGT ACC ACT GAC AAA GGA GAA GTC CCC AAT GGC TAC AAT GTC TCC   288
Glu Gly Thr Thr Asp Lys Gly Glu Val Pro Asn Gly Tyr Asn Val Ser
                75                  80                  85

AGA TTA AAC AAA CGG GAG TTC TCG CTC AGG CTG GAG TCG GCT GCT CCC   336
Arg Leu Asn Lys Arg Glu Phe Ser Leu Arg Leu Glu Ser Ala Ala Pro
            90                  95                  100

TCC CAG ACA TCT GTG TAC TTC TGT GCC AGC ACC                       369
Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser Thr
        105                 110
```

XV - INFORMATION POUR SEQ ID N° 14

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

TYPE : nucléotide et sa protéine correspondante

LONGUEUR : 356 paires de bases

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : ADNc pour ARNm

ORIGINE

ORGANISME : humain

LIGNEE CELLULAIRE : lymphocytes T humains

CARACTERISTIQUES

NOM DE L'ADN : IGR b 15

SEQUENCE Vβ 13

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE

```
                TGCTTGTAGC ATCTGCC ATG AGA ATC AGG CTC CTG TGC TGT GTG GCC    47
                                   Met Arg Ile Arg Leu Leu Cys Cys Val Ala
                                   1               5                  10

TTT TCT CTC CTG TGG GCA GGT CCA GTG ATT GCT GGG ATC ACC CAG GCA    95
Phe Ser Leu Leu Trp Ala Gly Pro Val Ile Ala Gly Ile Thr Gln Ala
                15                  20                  25

CCA ACA TCT CAG ATC CTG GCA GCA GGA CGG CGC ATG ACA CTG AGA TGT   143
Pro Thr Ser Gln Ile Leu Ala Ala Gly Arg Arg Met Thr Leu Arg Cys
            30                  35                  40

ACC CAG GAT ATG AGA CAT AAT GCC ATG TAC TGG TAT AGA CAA GAT CTA   191
Thr Gln Asp Met Arg His Asn Ala Met Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Leu
        45                  50                  55

GGA CTG GGG CTA AGG CTC ATC CAT TAT TCA AAT ACT GCA GGT ACC ACT   239
Gly Leu Gly Leu Arg Leu Ile His Tyr Ser Asn Thr Ala Gly Thr Thr
    60                  65                  70

GGC AAA GGA GAA GTC CCT GAT GGT TAT AGT GTC TCC AGA GCA AAC ACA   287
Gly Lys Gly Glu Val Pro Asp Gly Tyr Ser Val Ser Arg Ala Asn Thr
75                  80                  85                  90

GAT GAT TTC CCC CTC ACG TTG GCG TCT GCT GTA CCC TCT CAG ACA TCT   335
Asp Asp Phe Pro Leu Thr Leu Ala Ser Ala Val Pro Ser Gln Thr Ser
                95                  100                 105

GTG TAC TTC TGT GCC AGC AGT                                      356
Val Tyr Phe Cys Ala Ser Ser
            110
```

XVI - INFORMATION POUR SEQ ID N° 15

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

TYPE : nucléotide et sa protéine correspondante

LONGUEUR : 345 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 b 16

SEQUENCE Vβ

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE

```
                AAGGCCCAGC CCCTTTCCAT TGGGGCTGCA GCATCAGCTG TTTCCTTCTC    50

TGCAGGT CCA GTG AAT GCT GGT GTC ACT CAG ACC CCA AAA TTC CGC              96
        Pro Val Asn Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Arg
        1               5                   10

ATC CTG AAG ATA GGA CAG AGC ATG ACA CTG CAG TGT GCC CAG GAT ATG          144
Ile Leu Lys Ile Gly Gln Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met
    15                  20                  25

AAC CAT AAC TAC ATG TAC TGG TAT CGA CAA GAC CCA GGC ATG GGC CTG          192
Asn His Asn Tyr Met Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu
30                  35                  40                  45

AAG CTG ATT TAT TAT TCA GTT GGT GCT GGT ATC ACT GAT AAA GGA GAA          240
Lys Leu Ile Tyr Tyr Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Lys Gly Glu
                50                  55                  60

GTC CCG AAT GGC TAC AAC GTC TCC AGA TCA ACC ACA GAG GAT TTC CCG          288
Val Pro Asn Gly Tyr Asn Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro
        65                  70                  75

CTC AGG CTG GAG TTG GCT GCT CCC TCC CAG ACA TCT GTG TAC TTC TGT          336
Leu Arg Leu Glu Leu Ala Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys
    80                  85                  90

                                                                        345
GCC AGC AGT
Ala Ser Ser
    95
```

XVII - INFORMATION POUR SEQ ID N° 16

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

TYPE : nucléotide et sa protéine correspondante

LONGUEUR : 450 paires de bases

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : ADNc pour ARNm

ORIGINE

ORGANISME : humain

LIGNEE CELLULAIRE : lymphocytes T humains

CARACTERISTIQUES

NOM DE L'ADN : IGR b 17

SEQUENCE Vβ 7

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE

```
                                TGGAGCAGTG ACATCACAGG AAAAACCACC AACCAAGGCC    40

AAGGAGACCA GAGCCCAGCA CCTCACCCAG AGGACCCCAG TCAGAGGCCC CATCTCAGAC 100

          CCGAGGCCAG C ATG GGC TGC AGG CTG CTC TGC TGT GCG GTT CTC   144
                       Met Gly Cys Arg Leu Leu Cys Cys Ala Val Leu
                       1               5                   10

TGT CTC CTG GGA GCG GTC CCC ATG GAA ACG GGA GTT ACG CAG ACA CCA   192
Cys Leu Leu Gly Ala Val Pro Met Glu Thr Gly Val Thr Gln Thr Pro
            15                  20                  25

AGA CAC CTG GTC ATG GGA ATG ACA AAT AAG AAG TCT TTG AAA TGT GAA   240
Arg His Leu Val Met Gly Met Thr Asn Lys Lys Ser Leu Lys Cys Glu
        30                  35                  40

CAA CAT CTG GGG CAT AAC GCT ATG TAT TGG TAC AAG CAA AGT GCT AAG   288
Gln His Leu Gly His Asn Ala Met Tyr Trp Tyr Lys Gln Ser Ala Lys
    45                  50                  55

AAG CCA CTG GAG CTC ATG TTT GTC TAC AAC TTT AAA GAA CAG ACT GAA   336
Lys Pro Leu Glu Leu Met Phe Val Tyr Asn Phe Lys Glu Gln Thr Glu
60                  65                  70                  75

AAC AAC AGT GTG CCA AGT CGC TTC TCA CCT GAA TGC CCC AAC AGC TCT   384
Asn Asn Ser Val Pro Ser Arg Phe Ser Pro Glu Cys Pro Asn Ser Ser
                80                  85                  90

CAC TTA TGC CTT CAC CTA CAC ACC CTG CAG CCA GAA GAC TCG GCC CTG   432
His Leu Cys Leu His Leu His Thr Leu Gln Pro Glu Asp Ser Ala Leu
            95                  100                 105

TAT CTC TGT GCC AGC ACC                                          450
Tyr Leu Cys Ala Ser Thr
        110
```

XVIII - INFORMATION POUR SEQ ID N° 17

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

TYPE : nucléotide et sa protéine correspondante

LONGUEUR : 354 paires de bases

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : ADNc pour ARNm

ORIGINE

ORGANISME : humain

LIGNEE CELLULAIRE : lymphocytes T humains

CARACTERISTIQUES

NOM DE L'ADN : IGR b 18

SEQUENCE Vβ 7

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE

```
                AGACCCGAGG CTAGC ATG GGC TGC AGG CTG CTC TGC TCT GCG GTT CTC      48
                                 Met Gly Cys Arg Leu Leu Cys Ser Ala Val Leu
                                 1               5                  10

TGT CTC CTG GGA GCG GTC CCC ATG GAA ACG GGA GTT ACG CAG ACA CCA                  96
Cys Leu Leu Gly Ala Val Pro Met Glu Thr Gly Val Thr Gln Thr Pro
            15                  20                  25

AGA CAC CTG GTC ATG GGA ATG ACA AAT AAG AAG TCT TTG AAA TGT GAA                 144
Arg His Leu Val Met Gly Met Thr Asn Lys Lys Ser Leu Lys Cys Glu
        30                  35                  40

CAA CAT CTG GGT CAT AAC GCT ATG TAT TGG TAC AAG CAA AGT GCT AAG                 192
Gln His Leu Gly His Asn Ala Met Tyr Trp Tyr Lys Gln Ser Ala Lys
    45                  50                  55

AAG CCA CTG GAG CTC ATG TTT GTC TAC AGT CTT GAA GAA CGG GTT GAA                 240
Lys Pro Leu Glu Leu Met Phe Val Tyr Ser Leu Glu Glu Arg Val Glu
60                  65                  70                  75

AAC AAC AGT GTG CCA AGT CGC TTC TCA CCT GAA TGC CCC AAC AGC TCT                 288
Asn Asn Ser Val Pro Ser Arg Phe Ser Pro Glu Cys Pro Asn Ser Ser
                80                  85                  90

CAC TTA TCC CTT CAC CTA CAC ACC CTG CAG CCA GAA GAC TCG GCC CTG                 336
His Leu Ser Leu His Leu His Thr Leu Gln Pro Glu Asp Ser Ala Leu
            95                  100                 105

                                                                               354
TAT CTC TGC GCC AGC AGC
Tyr Leu Cys Ala Ser Ser
        110
```

XIX - INFORMATION POUR SEQ ID N° 18

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

TYPE : nucléotide et sa protéine correspondante

LONGUEUR : 368 paires de bases

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : ADNc pour ARNm

ORIGINE

ORGANISME : humain

LIGNEE CELLULAIRE : lymphocytes T humains

CARACTERISTIQUES

NOM DE L'ADN : IGR b 19

SEQUENCE Vβ 7

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE

```
                AGAGGCCCCA TCTCAGACCC GAGGCTAGC ATG GGC TGC AGG CTG CTC     47
                                                Met Gly Cys Arg Leu Leu
                                                1               5

TGC TGT GCG GTT CTC TGT CTC CTG GGA GCA GTT CCC ATA GAC ACT GAA     95
Cys Cys Ala Val Leu Cys Leu Leu Gly Ala Val Pro Ile Asp Thr Glu
            10                  15                  20

GTT ACC CAG ACA CCA AAA CAC CTG GTC ATG GGA ATG ACA AAT AAG AAG    143
Val Thr Gln Thr Pro Lys His Leu Val Met Gly Met Thr Asn Lys Lys
        25                  30                  35

TCT TTG AAA TGT GAA CAA CAT ATG GGG CAC AGG GCT ATG TAT TGG TAC    191
Ser Leu Lys Cys Glu Gln His Met Gly His Arg Ala Met Tyr Trp Tyr
    40                  45                  50

AAG CAG AAA GCT AAG AAG CCA CCG GAG CTC ATG TTT GTC TAC AGC TAT    239
Lys Gln Lys Ala Lys Lys Pro Pro Glu Leu Met Phe Val Tyr Ser Tyr
55                  60                  65                  70

GAG AAA CTC TCT ATA AAT GAA AGT GTG CCA AGT CGC TTC TCA CCT GAA    287
Glu Lys Leu Ser Ile Asn Glu Ser Val Pro Ser Arg Phe Ser Pro Glu
                75                  80                  85

TGC CCC AAC AGC TCT CTC TTA AAC CTT CAC CTA CAC GCC CTG CAG CCA    335
Cys Pro Asn Ser Ser Leu Leu Asn Leu His Leu His Ala Leu Gln Pro
            90                  95                  100

GAA GAC TCA GCC CTG TAT CTC TGC GCC AGC AGC                        368
Glu Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser Ser
        105                 110
```

XX - INFORMATION POUR SEQ ID N° 19

CARACTERISTIQUES DES SEQUENCES

TYPE : nucléotide et sa protéine correspondante

LONGUEUR : 432 paires de bases

NOMBRE DE BRINS : simple

CONFIGURATION : linéaire

TYPE DE MOLECULE : ADNc pour ARNm

ORIGINE

ORGANISME : humain

LIGNEE CELLULAIRE : lymphocytes T humains

CARACTERISTIQUES

NOM DE L'ADN : IGR b 20

SEQUENCE Vβ 9

DESCRIPTION DE LA SEQUENCE

```
                                    ACCTCTCAAC GGCAGTGAAA CCACAGCCTA GTCCTCTCAC   40

CACTGCAGAC CAGAATCCTG CCCTGGGCCT TGCCTGGTCT GCCTCACTCT GCC ATG                    96
                                                           MET
                                                            1

GGC TGC AGG CTC CTC TGC TGT GTG GTC TTC TGC CTC CTC CAA GCA GGT                   144
Gly Cys Arg Leu Leu Cys Cys Val Val Phe Cys Leu Leu Gln Ala Gly
            5                  10                  15

CCC TTG GAC ACA GCT GTT TCC CAG ACT CCA AAA TAC CTG GTC ACA CAG                   192
Pro Leu Asp Thr Ala Val Ser Gln Thr Pro Lys Tyr Leu Val Thr Gln
        20                  25                  30

ATG GGA AAC GAC AAG TCC ATT AAA TGT GAA CAA AAT CTG GGC CAT GAT                   240
Met Gly Asn Asp Lys Ser Ile Lys Cys Glu Gln Asn Leu Gly His Asp
    35                  40                  45

ACT ATG TAT TGG TAT AAA CAG GAC TCT AAG AAA TTT CTG AAG ATA ATG                   288
Thr Met Tyr Trp Tyr Lys Gln Asp Ser Lys Lys Phe Leu Lys Ile Met
50                  55                  60                  65

TTT AGC TAC AAT AAT AAG GAG CTC ATT ATA AAT GAA ACA GTT CCA AAT                   336
Phe Ser Tyr Asn Asn Lys Glu Leu Ile Ile Asn Glu Thr Val Pro Asn
                70                  75                  80

CGC TTC TCA CCT AAA TCT CCA GAC AAA GCT CAC TTA AAT CTT CAC ATC                   384
Arg Phe Ser Pro Lys Ser Pro Asp Lys Ala His Leu Asn Leu His Ile
            85                  90                  95

AAT TCC CTG GAG CTT GGT GAC TCT GCT GTG TAT TTC TGT GCC AGC AGC                   432
Asn Ser Leu Glu Leu Gly Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ser Ser
        100                 105                 110
```

XXI - INFORMATION POUR SEQ ID N° 20 à 24

OLIGONUCLEOTIDES

SEQ ID N° 20 5'-TATCTGGAGTCATTGAGGGCGGGC

SEQ ID N° 21 5'-GCATGCGCGCGGCCGCGGAGG-14C

SEQ ID N° 22 5'-TGTGGCCAGGCATGCCAGTGTGGCC

SEQ ID N° 23 5'-GGTGTGGGAGAATTCTGCTTCTGA

SEQ ID N° 24 5'-TCTGCTTCTGATGGCTCAA.

SEQ ID N°	Sequence	Type	Clone	Position
25	5'-CCGCACAACAGTTCCCTGACTTGC-3'	Vβ1	HBVT73	251
26	5'-GGCCACATACGAGCAAGGCGTCGA-3'	Vβ2	MOLT4	210
27	5'-CGCTTCTCCCGGATTCTGGAGTCC-3'	Vβ3	DT259	232*
28	5'-TTCCCATCAGCCGCCCAAACCTAA-3'	Vβ4	DT110	257
29	5'-AGCTCTGAGCTGAATGTGAACGCC-3'	Vβ5	VB12A1	199*
30	5'-TCTCAGGTGTGATCCAAATTCGGG-3'	Vβ6	ATL12.2	117
31	5'-CCTGAATGCCCCAACAGCTCTCTC-3'	Vβ7	PL4.9	169*
32	5'-CCATGATGCGGGGACTGGAGTTGC-3'	Vβ8	PH11	170
33	5'-TTCCCTGGAGCTTGGTGACTCTGC-3'	Vβ9	PL2.6	201*
34	5'-CCACGGAGTCAGGGGACACAGCAC-3'	Vβ10	ATL12-1	299
35	5'-TGCCAGGCCCTCACATACCTCTCA-3'	Vβ11	PL3.12	297
36	5'-TGTCACCAGACTGGGAACCACCAC-3'	Vβ12	VBPH27	109*
37	5'-CACTGCGGTGTACCCAGGATATGA-3'	Vβ13	CEM-VB1	116
38	5'-GGGCTCGGCTTAAGGCAGACCTAC-3'	Vβ14	VBPH21	175
39	5'-CAGGCACAGGCTAAATTCTCCCTG-3'	Vβ15	ATL2-1	262
40	5'-GCCTGCAGAACTGGAGGATTCTGG-3'	Vβ16	HBP42	192*
41	5'-CTGCTGAATTTCCCAAAGAGGGCC-3'	Vβ17	VBPH29	254
42	5'-TGCCCCAGAATCTCTCAGCCTCCA-3'	Vβ18	HUT102	173*
43	5'-TCCTCTCACTGTGACATCGGCCCA-3'	Vβ19	HBVT02	279
44	5'-TCTCAATGCCCCAAGAACGCACCC-3'	Vβ20	HBVT72	274
45	5'-TCCAACCTGCAAGGCTTGACGACT-3'	Vβw21	IGRb01I	318
46	5'-AAGTGATCTTGCGCTGTGTCCCCA-3'	Vβw22	IGRb03	110
47	5'-GCAGGGTCCAGGTCAGGACCCCCA-3'	Vβw23	IGRa04	155*
48	5'-CCCAGTTTGGAAAGCCAGTGACCC-3'	Vβw24	IGRa05	95
49	5'-GGTGTGGGAGAATTCTGCTTCTGA-3'	CβA		71
50	5'-ACCAGCTCAGCTCCGCGGGGTCGG-3'	CβB		135
51	5'-TCTGCTTCTGATGGCTCAA-3'	CβC		58
52	5'-ATTTGCGGTGGACGATGGAGGGGC-3'	Act 1	ß-actine	1161
53	5'-GGCATCGTCACCAACTGGGACGAC-3'	Act 2	ß-actine	261
54	5'-ACCACCACGGCGGAGCGGG-3'	Act 3	ß-actine	642
55	5'-GTTGCTCCAGGCCGCGGCACTGTT-3'	CαE		201
56	5'-CCCTGACCCTGCCGTGTACCAGCT-3'	CαJ		12
57	5'-GTCACTGGATTTAGAGTCT-3'	CαC		57

REVENDICATIONS

1. Séquences nucléotidiques codant pour des régions variables de chaînes β des récepteurs des lymphocytes T humains, correspondant à des ADNc comprenant des séquences nucléotidiques choisies parmi l'un quelconque des segments Vβ correspondant à l'une des séquences SEQ ID N° 2 à 19, et les séquences qui en diffèrent par un ou plusieurs nucléotides.

2. Séquences selon la revendication 1 codant pour des régions variables des chaînes β des récepteurs des lymphocytes T humains, correspondant à des ADNc comprenant des séquences nucléotidiques choisies parmi l'un quelconque des segments Vβ correspondant à l'une des séquences SEQ ID N° 2 à 5, et les séquences qui en diffèrent par un ou plusieurs nucléotides.

3. Séquences nucléotidiques codant pour des régions variables de chaînes β 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 Vβ correspondant à l'une des séquences SEQ ID N° 2 à 5, et les séquences qui en diffèrent par un ou deux nucléotides.

4. Séquences nucléotidiques codant pour des régions variables de chaînes β des récepteurs des lymphocytes T humains correspondant à des ADNc correspondant à l'une des séquences nucléotidiques choisies parmi l'un quelconque des segments Vβ correspondant à l'une des séquences SEQ ID N° 6 à 15, les séquences qui en diffèrent par un ou deux nucléotides et les fragments de celles-ci.

5. Séquences nucléotidiques selon la revendication 4 dans laquelle les fragments des séquences correspondent à tout ou partie des séquences nucléotidiques choisies parmi l'un quelconque des segments V β correspondant à l'une des séquences

1 à 155 de SEQ ID N° 8

1 à 125 de SEQ ID N° 9

1 à 111 de SEQ ID N° 10

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

6. Séquences nucléotidiques codant pour des régions

variables de chaînes 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 Vβ correspondant à l'une des séquences

1 à 195 de SEQ ID N° 16
1 à 99 de SEQ ID N° 17
1 à 113 de SEQ ID N° 18
1 à 186 de SEQ ID N° 19

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

7. Peptides codés par l'une quelconque des séquences nucléotidiques telles que définies à l'une quelconque des revendications 1 à 6, ainsi que les allèles et les dérivés de ceux-ci qui possèdent la même fonction.

8. Vecteurs d'expression comprenant une séquence d'ADN codant pour l'un des peptides tel que défini à la revendication 7.

9. Hotes transformés avec un vecteur selon la revendication 8.

10. Anticorps dirigés contre un déterminant antigénique d'un des peptides définis à la revendication 7.

11. Anticorps selon la revendication 10 qui est un anticorps monoclonal ou un fragment de celui-ci.

12. Fragment Fab, Fab' ou F(ab')2 d'un anticorps monoclonal selon la revendication 11 et dérivés de celui-ci.

13. Dérivés d'un anticorps monoclonal ou d'un fragment de celui-ci selon la revendication 11 ou
12 auxquels sont liés un marqueur détectable et/ou au moins une molécule thérapeutique.

14. Hybridomes produisant un anticorps selon la revendication 11.

15. Composition de diagnostic comprenant un ou plusieurs anticorps monoclonaux, fragments ou dérivés de ceux-ci tels que définis à l'une quelconque des revendications 11 à 13.

16. Composition thérapeutique comprenant un ou plusieurs anticorps monoclonaux, fragments ou dérivés de ceux-ci tels que définis à l'une des revendications 11 à 13.

17. Composition selon la revendication 16 comprenant des dérivés contenant une molécule cytotoxique ou un radioisotope.

18. Composition thérapeutique comprenant au moins l'un des peptides définis à la revendication 7.

19. Composition thérapeutique comprenant des oligonucléotides antisens correspondant à l'une quelconque des séquences d'un segment Vβ telles que définies à l'une quelconque des revendications 3 à 6.

20. Utilisation, en tant qu'amorces pour l'amplification d'ADN, de séquences nucléotidiques d'environ au moins 17 nucléotides comprises dans l'une quelconque des séquences d'un segment Vβ telles que définies à l'une quelconque des revendications 3 à 6.

21. Utilisation, en tant que sonde de détection, de séquences nucléotidiques d'environ au moins 10 nucléotides comprises dans l'une quelconque des séquences d'un segment Vβ telles que définies à l'une quelconque des revendications 3 à 6.

22. Oligonucléotides, utilisables comme amorces pour l'amplification d'ADN correspondant à des régions variables de chaînes β des récepteurs de cellules T, choisis parmi les séquences SEQ ID N° 25 à 48.

23. Utilisation, comme amorces pour l'amplification d'ADN correspondant à des régions variables de chaînes des récepteurs des cellules T, d'oligonucléotides selon la revendication 22.

24. Utilisation selon la revendication 23, d'oligonucléotides choisis parmi les séquences SEQ ID N° 45, 46, 47 et 48.

25. Procédé de détection de séquences nucléotidiques codant pour des segments Vβ 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 22 et un oligonucléotide appartenant au segment Cβ, et

b) la détection des séquences amplifiées avec une sonde Cβ.

26. Procédé selon la revendication 25, 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.

27. Kit de diagnostic pour la mise en oeuvre d'un procédé selon la revendication 25, caractérisé en ce qu'il comprend :

a) au moins un oligonucléotide selon la revendication 22,

b) une amorce Cβ,

c) une sonde Cβ.

28. Kit de diagnostic pour la mise en oeuvre d'un procédé selon la revendication 26, caractérisé en ce qu'il comprend :

a) au moins un oligonucléotide selon la revendication 22,

b) une amorce Cβ,

c) une paire d'amorces contrôle,

d) une sonde Cβ,

e) une sonde contrôle.

29. Kit selon la revendication 28 ou la revendication 29, comprenant :

a) l'ensemble des 24 oligonucléotides selon la revendication 22,

b) une amorce Cβ choisie parmi les séquences correspondant aux séquences SEQ ID 49 et 50,

c) une paire d'amorces contrôle pour la β-actine ayant une séquence correspondant respectivement aux séquences SEQ ID N° 52 et 53,

d) une sonde Cβ correspondant à la séquence SEQ ID N° 51,

e) une sonde contrôle pour la β-actine correspondant à la séquence SEQ ID N° 54.

30. Hybridomes RO-73 et JU-74 produisant des anticorps monoclonaux anti Vβ13 déposés à la CNCM le 12 février 1992 sous les n°s I-1172 et I-1173 .

31. Anticorps monoclonaux anti Vβ13 produit par les hybridomes selon la revendication 30.

FEUILLE DE REMPLACEMENT

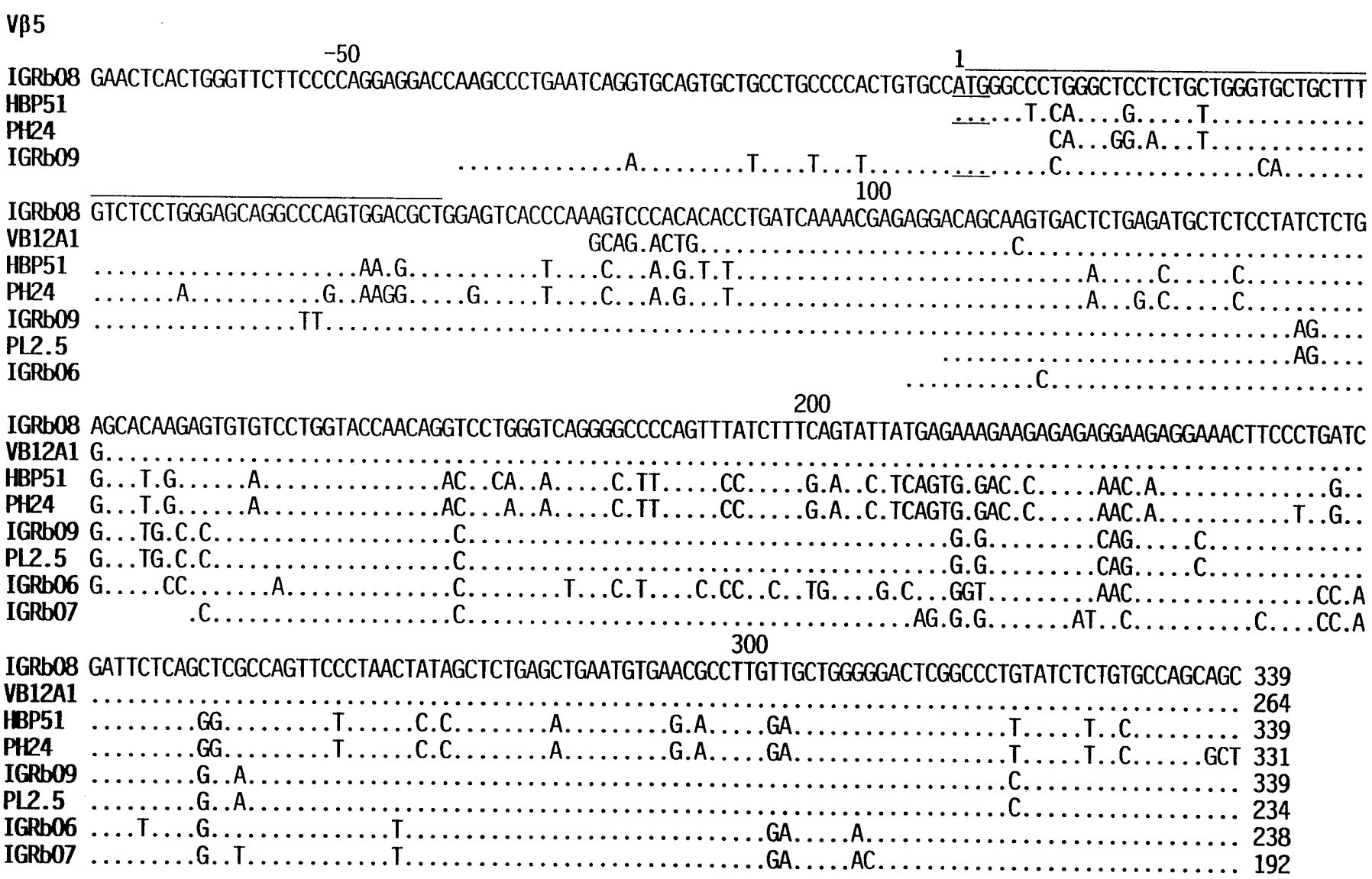


FIG.1

FEUILLE DE REMPLACEMENT

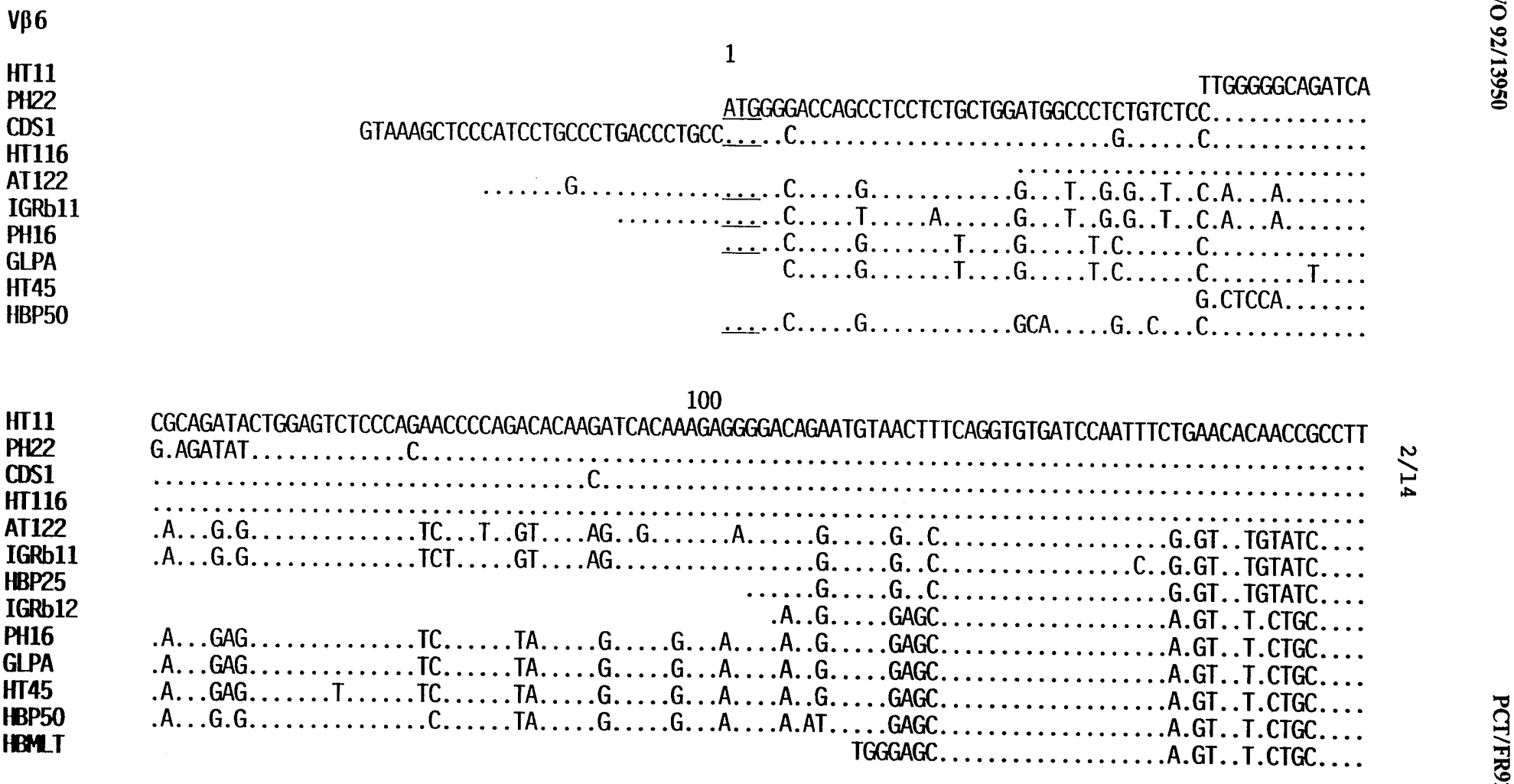


FIG.2

FEUILLE DE REMPLACEMENT

```
                                                
```

Vβ12

```
        1_____________________________________
PH27    CAACTTGTGCCCTTTGTCTCCTGTGGACAGGACACATGGATGGATGCTGGAATCACCC
PL4.2
IGRb13                            T.........G....----....A........

                                                  100
PH27    AGAGCCCAAGACACAAGGTCACAGAGACAGGAACACCAGTGACTCTGAGATGTCACCA
PL4.2                                ..............................
IGRb13 ..................A...............GG.AG.....CT..GCG........

PH27    GACTGAGAACCACCGCTATATGTACTGGTATCGACAAGACCCGGGGCATGGGCTGAGG
PL4.2   ...................C......................................
IGRb13 ....TG.......AA.A......T..................T...A............

                                 200
PH27    CTGATCCATTACTCATATGGTGTTAAAGATACTGACAAAGGAGAAGTCTCAGATGGCT
PL4.2   ..A.......................................................
IGRb13 .......................C....C...A........................

PH27    ATAGTGTCTCTAGATCAAAGACAGAGGATTTCCTCCTCACTCTGGAGTCCGCTACCAG
PL4.2   ..............................................-........
IGRb13 .C..................C........CC...C...............T...G..TC

                300
PH27    CTCCC-AGACATCTGTGTACTTCTGTGCCATCAGC 324
PL4.2   .....G.......................CT..A 237
IGRb13 .....-..........A..T.....C....G...G 294
```

FIG. 3

Vβ13

```
                                        1
IGRb14 AGAAGACCCCTCCATCCTGTAGCACCTGCCATGAGCATCGGGCTCCTGTGCTGTGTGGCCTTTTCTCTCCTGTGGGCAAGTCCAGTGAATGCTGGTGT
IGRb15                TG.T.......T.........A...A.....................................G.........T......GA.
IGRb16                          aaggcccagcccctttccattggggctgcagcatcagctgtttccttctctgcag...................
HBVP34                                ...........C.............CA.....G...............G...................
CEM                     ..CG..TT.........C..................G.......................G...................

                                      100
IGRb14 CACTCAGACCCCAAAATTCCAGGTCCTGAAGACAGGACAGAGCATGACACTGCAGTGTGCCCAGGATATGAACCATAACTCCATGTACTGGTATCGAC
IGRb15 ...C...G.A....C..CT...A.....GCAG......G.C...........AGA...A............GA.....TG..............A...
IGRb16 ....................GCA.........T.............................................A.................
HBVP34 ..................................................................G.A.A.....C...........
CEM    ....................G...............................T.......................G.A.A.................

                                        200
IGRb14 AAGACCCAGGCATGGGACTGAGGCTGATTTATTACTCAGCTTCTGAGGGTACCACTGACAAAGGAGAAGTCCCCAATGGCTACAATGTCTCCAGATTA
IGRb15 ....T.T...AC....G..A.....C..CC....T...AA.A...CA..........G...............TG....T..T.G..........GC.
IGRb16 ................G....A............T....T.GG..CT....T......T..............G...........C..........C.
HBVP34 ................G............C.........T.GG..CT....T.......C...................................C.
CEM    ...............-G............C.........T.GG.........A....C.........G.....TG.......................

                                          300
IGRb14 AACAAACGGGAGTTCTCGCTCAGGCTGGAGTCGGCTGCTCCCTCCCAGACATCTGTGTACTTCTGTGCCAGCACC 339
IGRb15 ....C.GAT..T...C.C....C.T...C...T....TA.....T...........................GT 339
IGRb16 .C..C.GA...T...C...............T.......................................GT 345
HBVP34 .C..C.GA...T...C...........CT.........................................GT 339
CEM    ..A....A.A.T...CT...GG..T.......................A........................G. 339
```

FIG.4

FEUILLE DE REMPLACEMENT

Vβ7

```
                                                  1
IGRb17 GACCCCAGTCAGAGGCCCCATCTCAGACCCGAGGCTAGCATGGGCTGCAGGCTGCTCTGCTGTGCGGTTCTCTGTCTCCTGGGAGCGGTCCCCATGGAAA
IGRb18                                ...............C.....................................
IGRb19                                                ...........................................A..T.....A..C.

                                                100
IGRb17 CGGGAGTTACGCAGACACCAAGACACCTGGTCATGGGAATGACAAATAAGAAGTCTTTGAAATGTGAACAACATCTGGGGCATAACGCTATGTATTGGTA
IGRb18 ..........................................................................T....................
IGRb19 .T.A......C..........A.......................................................A.......C.GG..............
PL4.9                                ...................................................A.......C.GG..A...........

                                                200
IGRb17 CAAGCAAAGTGCTAAGAAGCCACTGGAGCTCATGTTTGTCTACAACTTTAAAGAACAGACTGAAAACAACAGTGTGCCAAGTCGCTTCTCACCTGAATGC
IGRb18 ..........................................GTC..G......G.GT.....................................
PL4.19                                                                  .T.CGCT.C...G.................
IGRb19 ......G.AA.............C....................G..A.G.GA...TCT..AT...TG.A...............................
VPL4.9 ......G.AA.............C....................G..A.G.GA...TCT..AT...TG.A...............................

                                                300
IGRb17 CCCAACAGCTCTCACTTATGCCTTCACCTACACACCCTGCAGCCAGAAGACTCGGCCCTGTATCTCTGTGCCAGCACC 339
IGRb18 ...................C.............................................C.......G. 339
PL4.19 ...................T.............................................C.......G. 108
IGRb19 .............T....AA.............G...................A..............C.......G. 339
PL4.9  .............T....AA.............G...................A..............C.......G. 255
```

FIG.5

FEUILLE DE REMPLACEMENT

Vβ9

```
                                                  1
IGRb20 ATCCTGCCCTGGGCCTTGCCTGGTCTGCCTCACTCTGCCATGGGCTGCAGGCTCCTCTGCTGTGTGGTCTTCTGCCTCCTCCAAGCAGGTCCCTTGGACA

                                                100
IGRb20 CAGCTGTTTCCCAGACTCCAAAATACCTGGTCACACAGATGGGAAACGACAAGTCCATTAAATGTGAACAAAATCTGGGCCATGATACTATGTATTGGTA
PL2.6                                   ...G..T.........................................................

                                                200
IGRb20 TAAACAGGACTCTAAGAAATTTCTGAAGATAATGTTTAGCTACAATAATAAGGAGCTCATTATAAATGAAACAGTTCCAAATCGCTTCTCACCTAAATCT
PL2.6  ..................................................................................................

                                                300
IGRb20 CCAGACAAAGCTCACTTAAATCTTCACATCAATTCCCTGGAGCTTGGTGACTCTGCTGTGTATTTCTGTGCCAGCAGC 339
PL2.6  ..................................................................... 246
```

FIG.6

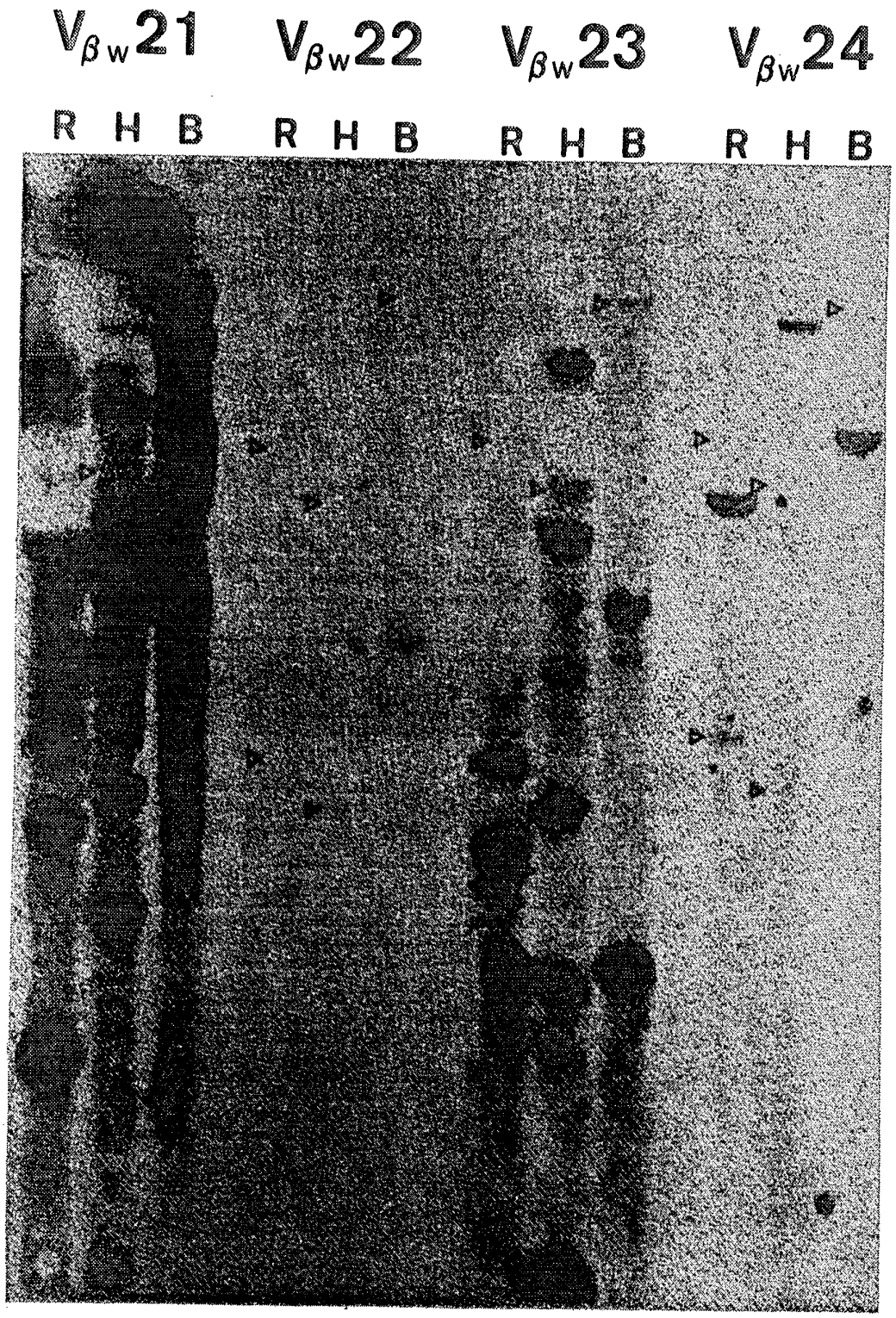


FIG.7

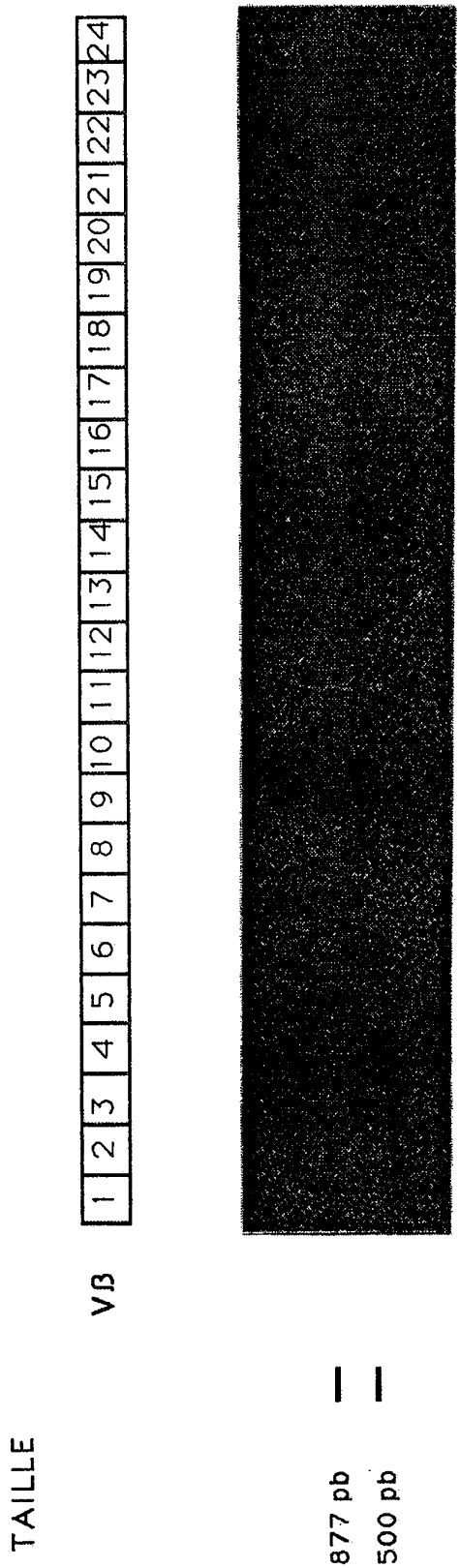
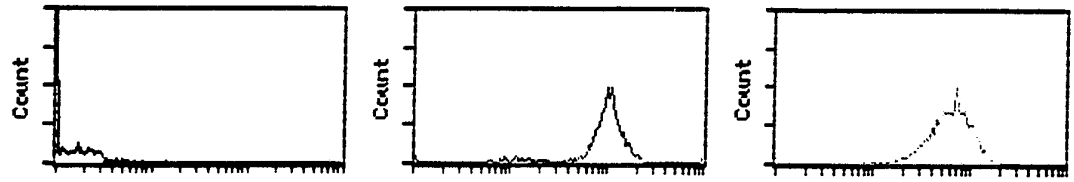

AMORCES Vß SPECIFIQUES
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24
Vß
TAILLE
877 pb
500 pb

FIG. 8

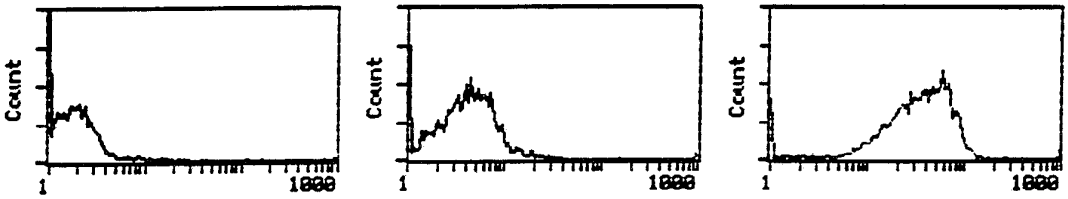
FIGURE 9

(A) CLONE 3025



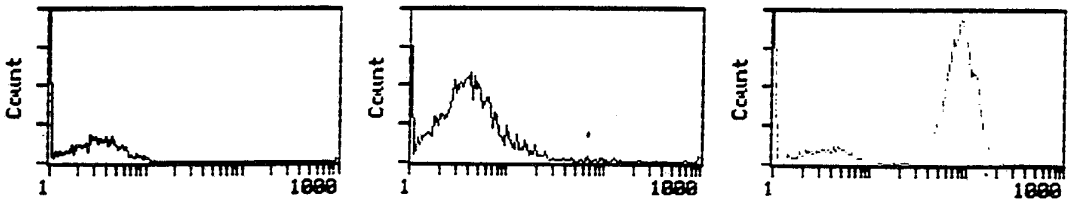
NKTa RO-73 OKT3

(B) CLONE 12410



NKTa RO-73 OKT3

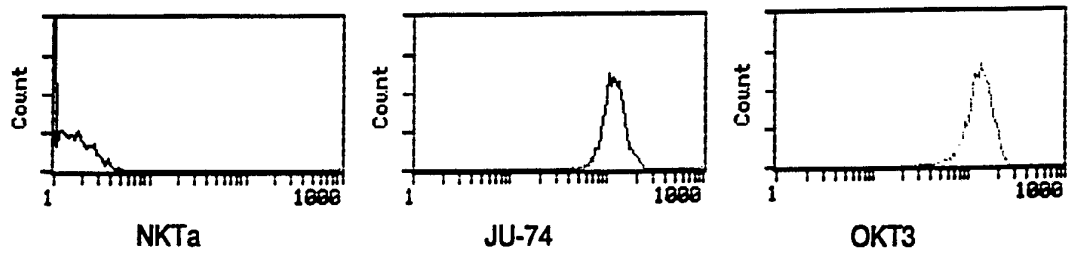
(C) Lymphocytes circulants



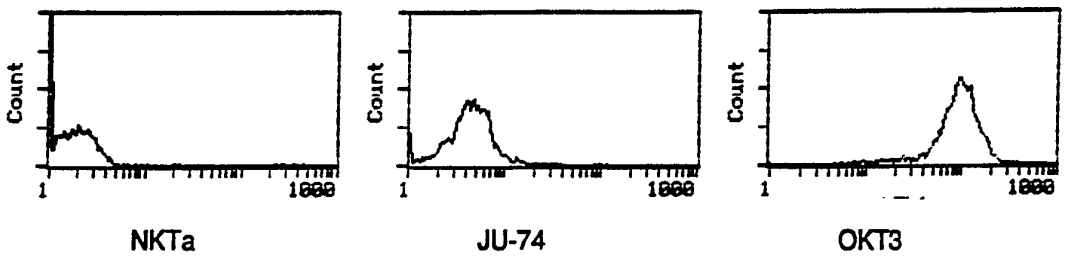
NKTa RO-73 OKT3

FIGURE 10

(A) CLONE 3025



(B) CLONE 12410



(C) Lymphocytes circulants

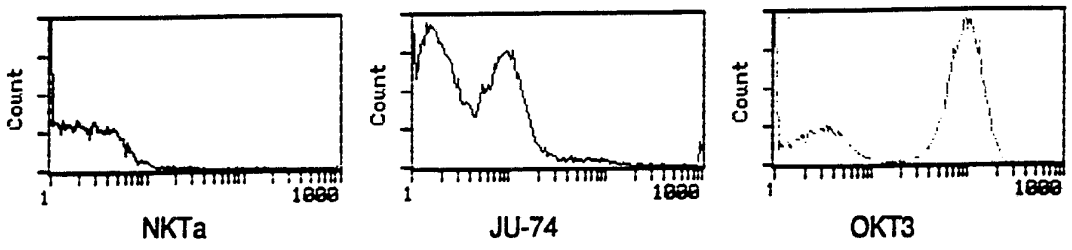


FIGURE 11

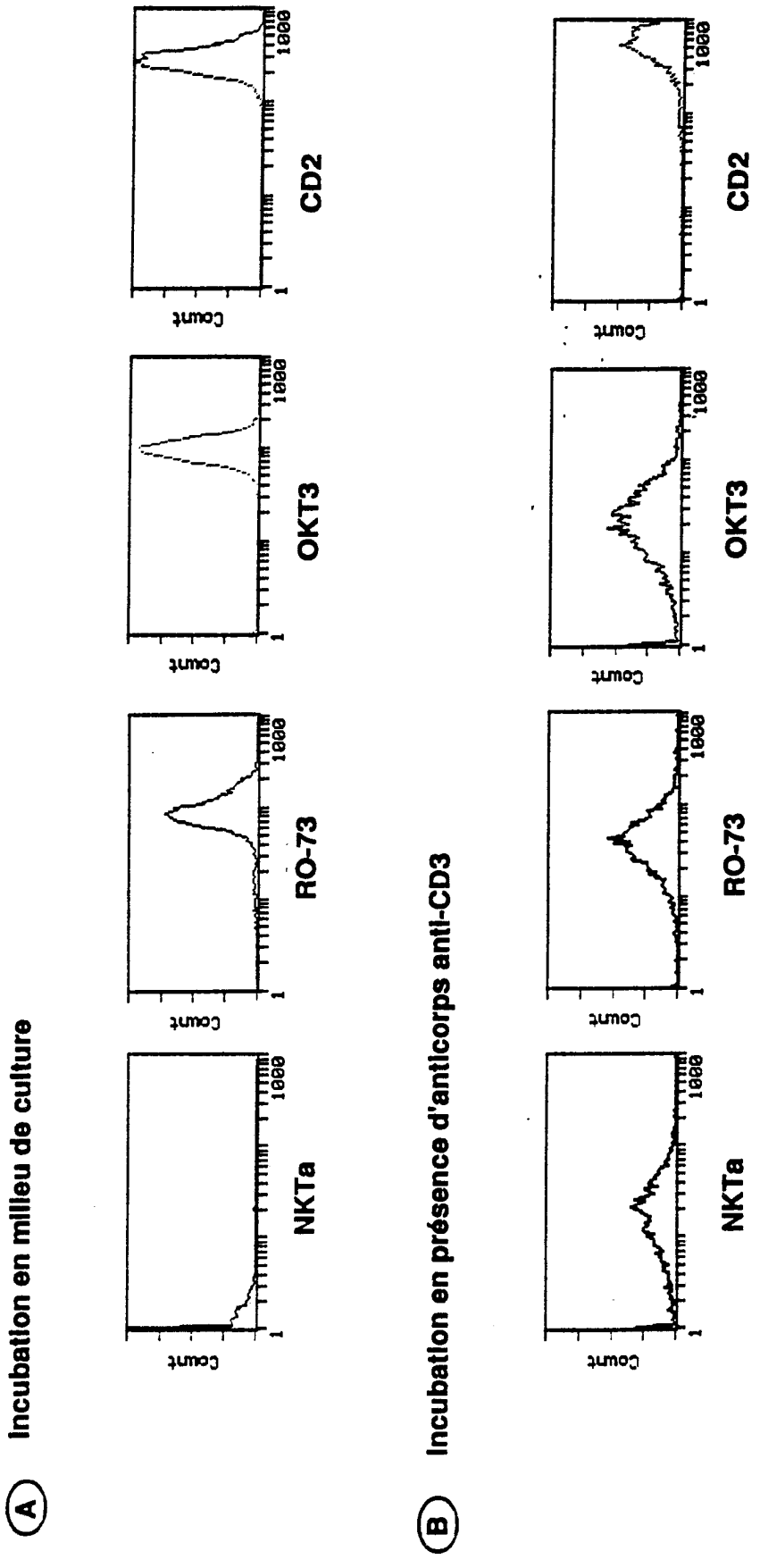
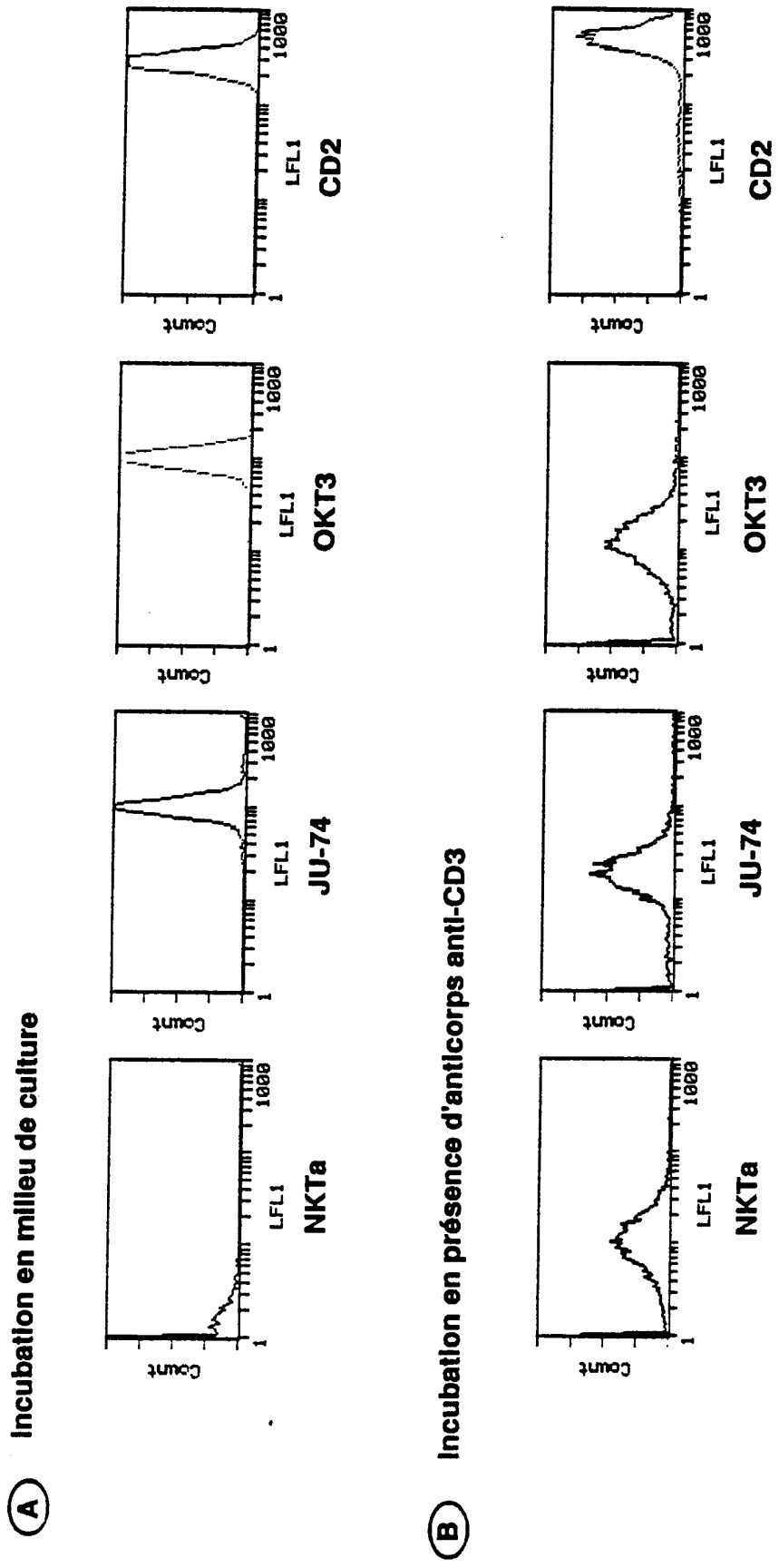
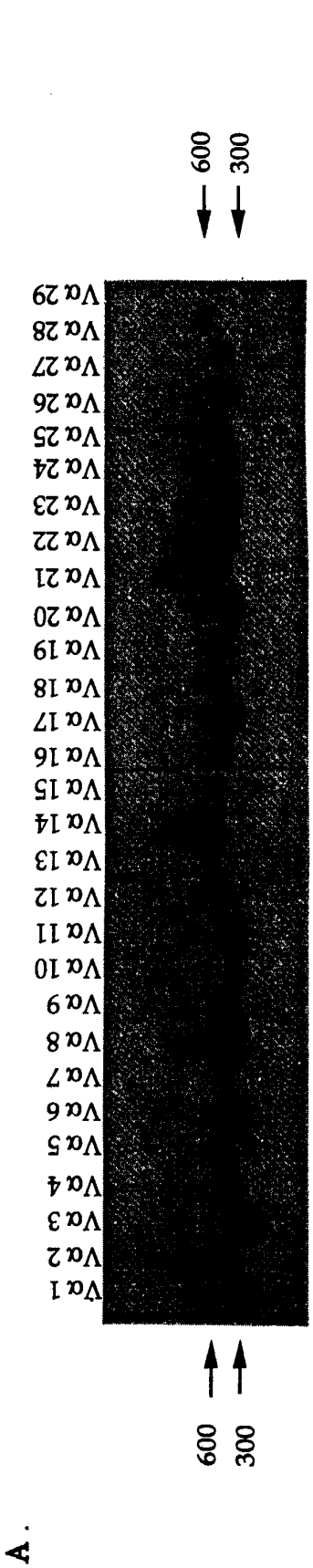

A
Incubation en milieu de culture
NKTa
RO-73
OKT3
CD2
B
Incubation en présence d'anticorps anti-CD3
NKTa
RO-73
OKT3
CD2
Count
1
1000

FIGURE 12


A
Incubation en milieu de culture
B
Incubation en présence d'anticorps anti-CD3
NKTa
JU-74
OKT3
CD2
Count
LFL1
1
1000


600
300
Vα 29
Vα 28
Vα 27
Vα 26
Vα 25
Vα 24
Vα 23
Vα 22
Vα 21
Vα 20
Vα 19
Vα 18
Vα 17
Vα 16
Vα 15
Vα 14
Vα 13
Vα 12
Vα 11
Vα 10
Vα 9
Vα 8
Vα 7
Vα 6
Vα 5
Vα 4
Vα 3
Vα 2
Vα 1
600
300
A.

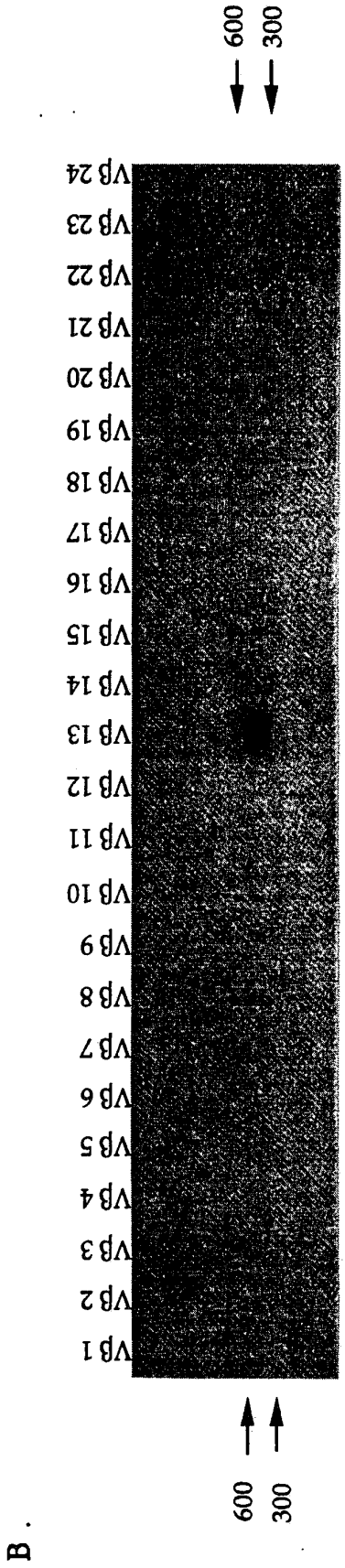

600
300
Vβ 24
Vβ 23
Vβ 22
Vβ 21
Vβ 20
Vβ 19
Vβ 18
Vβ 17
Vβ 16
Vβ 15
Vβ 14
Vβ 13
Vβ 12
Vβ 11
Vβ 10
Vβ 9
Vβ 8
Vβ 7
Vβ 6
Vβ 5
Vβ 4
Vβ 3
Vβ 2
Vβ 1
600
300
B.

FIG.13