

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 22.04.02.

③① Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 24.10.03 Bulletin 03/43.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥① Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : CENTRE NATIONAL DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE CNRS Etablissement
public à caractère scientifique et technologique — FR.

⑦② Inventeur(s) : KIM FELIX JINHYUN, MANEL NICO-
LAS GABRIEL ALBERT et SITBON MARC KHAMOUS
MICHEL.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : GROSSET FOURNIER ET DEMA-
CHY SARL.

⑤④ OLIGONUCLEOTIDES ISSUS DES SEQUENCES CODANT POUR LA COMPOSANTE DE SURFACE DES
PROTEINES D'ENVELOPPE DES PTLV ET LEURS UTILISATIONS.

⑤⑦ L'invention a pour objet l'utilisation d'oligonucléotides
issus des séquences nucléotidiques codant pour la région
aminoterminal de la composante de surface (SU) des pro-
téines d'enveloppe des virus des PTLV, pour la mise en
oeuvre de procédés de détection de toute souche de PTLV,
ou de virus apparentés aux PTLV, notamment pour la dé-
tection de nouveaux variants des PTLV, ou de virus com-
portant des séquences apparentées aux SU des PTLV.
L'invention a également pour objet des couples d'amorces
pour la mise en oeuvre de ces procédés de détection, ainsi
que les nouveaux variants de PTLV ainsi détectés.

FR 2 838 740 - A1



OLIGONUCLEOTIDES ISSUS DES SEQUENCES CODANT POUR LA COMPOSANTE DE SURFACE DES PROTEINES D'ENVELOPPE DES PTLV ET LEURS UTILISATIONS

5

La présente invention a pour objet des oligonucléotides issus des séquences nucléotidiques codant pour la région aminoterminal de la composante de surface des protéines d'enveloppe des virus des lymphomes/leucémies T chez les primates, regroupés sous la désignation PTLV, et leurs utilisations dans le cadre de la détection de toute souche de PTLV ou de souches virales apparentées.

10

La présente invention découle de l'identification par les Inventeurs de motifs peptidiques de la SU qui conviennent à la synthèse d'oligonucléotides pouvant être utilisés pour la détection et l'amplification de séquences pan-PTLV comprenant ces motifs. Les inventeurs ont mis au point une méthode permettant l'amplification de telles séquences, leur clonage et séquençage. La présente invention permet notamment la détection de séquences individuelles présentes dans un mélange de séquences des différents types. L'optimisation pour certains des motifs peptidiques ainsi identifiés a déjà permis la caractérisation de variants PTLV jamais encore décrits, ainsi que de détecter des séquences PTLV dont la présence dans les échantillons testés n'était pas suspectée. L'application généralisée de la présente invention permettra la détection et la caractérisation soit de nouvelles séquences apparentées aux SU de PTLV, soit de séquences déjà connues dans de nouveaux contextes pathologiques ou non.

15

20

La recherche de séquences des rétrovirus humains ou de primates est primordiale dans de nombreux contextes. De manière non-exhaustive, ces recherches intéressent le criblage de matériels biologiques (produits dérivés du sang, par exemple), le diagnostic (recherche de l'étiologie de syndromes multiples couvrant leucémies, maladies dégénératives, maladies autoimmunes, etc), les études épidémiologiques et anthropologiques des différents groupes humains, le séquençage des génomes (composition et marqueurs rétroviraux polymorphiques des génomes), le criblage de nouveaux médicaments (définition de nouvelles cibles), etc.

25

Dans le cas des PTLV, nous relèverons deux exemples des problèmes associés à la détection de leurs séquences. Dans le premier exemple, des individus, généralement réunis sous le terme de "séroindéterminés", présentent une réponse immune anti-HTLV dite "incomplète", dirigée contre certains antigènes seulement des PTLV, alors qu'aucune séquence correspondant à des PTLV ne peut être amplifiée à partir d'échantillons sanguins de

30

ces patients. Dans les cas les mieux documentés la recherche de telles séquences se fait sur des régions conservées des gènes *gag*, *pol*, *env* et *tax*. Dans le cas du gène d'enveloppe, la partie amino terminale de la SU est écartée de cette approche du fait de sa variabilité. La région amino terminale, de la composante de surface (SU) des enveloppes des rétrovirus de primates humains et non-humains de type HTLV et STLV (regroupés ici sous le terme PTLV) est notamment responsable de la reconnaissance du ou des récepteurs cellulaires pour l'enveloppe (Kim et coll, 2000). À ce jour, aucune méthode d'amplification dans cette région directement applicable aux trois types de PTLV (application dite pan-PTLV) n'a été décrite. Ainsi, généralement seule est considérée l'amplification de motifs présents dans les parties les plus conservées de la composante transmembranaire de l'enveloppe (TM). Toutefois, dans la mesure où la variabilité de la SU est un élément essentiel de la biologie adaptative des rétrovirus, la mise au point d'une approche basée sur sa détection représente un objectif particulièrement intéressant.

La présente invention a pour objet l'utilisation d'oligonucléotides issus des séquences nucléotidiques codant pour la région aminoterminal de la composante de surface (SU) des protéines d'enveloppe des virus des lymphomes / leucémies T chez les primates, regroupés sous la désignation PTLV, ces virus étant encore désignés HTLV chez l'homme et STLV chez le singe, pour la mise en œuvre de procédés de détection de toute souche de PTLV, à savoir de toute souche appartenant aux HTLV-1, HTLV-2, STLV-1, STLV-2, et STLV-3, ainsi que de toute souche de virus apparentés aux PTLV, à savoir de toute souche dont la séquence en acides aminés déduite de la séquence nucléotidique codant pour la région aminoterminal de la SU présente un taux d'homologie d'au moins environ 30% avec les séquences en acides aminés codées par les séquences nucléotidiques correspondantes chez les PTLV, notamment pour la détection de nouveaux variants des PTLV, ou de virus, nouveaux ou non, comportant des séquences apparentées aux SU des PTLV, le cas échéant dans de nouveaux contextes pathologiques.

L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée d'oligonucléotides tels que définis ci-dessus, comprenant environ 15 à environ 30 nucléotides correspondant à des fragments polypeptidiques d'environ 5 à environ 10 acides aminés issus de fragments protéiques délimités du côté N-terminal par un acide aminé situé entre les positions 75 à 90, et du côté C-terminal par un acide aminé situé entre les positions 230 à 245 des protéines d'enveloppe des différentes souches de PTLV, ou de virus portant des séquences apparentées aux SU des PTLV.

L'invention a également plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée d'oligonucléotides tels que définis ci-dessus, comprenant environ 15 à environ 30 nucléotides correspondant à des fragments polypeptidiques d'environ 5 à environ 10 acides aminés issus de fragments protéiques délimités par les acides aminés situés aux positions 80 à 245, et plus particulièrement aux positions 83 à 241, de la protéine d'enveloppe de la souche MT-2 de HTLV-1 (Gray et al., 1990, Virology, 177 : 391-395 ; n° d'accès Genbank M37747).

L'invention concerne plus particulièrement encore l'utilisation susmentionnée d'oligonucléotides tels que définis ci-dessus, correspondant aux fragments polypeptidiques 83-88, 140-145, 222-228, et 237-241, de la protéine d'enveloppe de la souche MT-2 de HTLV-1, à savoir les fragments suivants :

83-YL/VFPHW-88

140 - NFTQ/REV - 145

222-NYS/TCI/MVC-228

237-WHVLY-241

15

L'invention concerne plus particulièrement encore l'utilisation susmentionnée d'oligonucléotides 5' issus du brin ADN (+) correspondant au fragment polypeptidique 83-88 défini ci-dessus, lesdits oligonucléotides étant choisis parmi ceux de formule suivante :

TAYBTNTTYCCNCAYTGG

20

dans laquelle :

Y représente C ou T,

B représente C, G ou T,

N représente A, C, G ou T.

A ce titre l'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée d'oligonucléotides 5' choisis parmi les suivants :

PTLVE5'83a TAYBTNTTYCCNCACTGG

PTLVE5'83b TAYBTNTTYCCNCATTGG

Y, B et N étant tels que définis ci-dessus.

L'invention concerne plus particulièrement encore l'utilisation susmentionnée d'oligonucléotides 5' issus du brin ADN (+) correspondant au fragment polypeptidique 140-145 défini ci-dessus, lesdits oligonucléotides étant choisis parmi ceux de formule suivante :

AAYYTYACNCARGARGT

dans laquelle :

Y représente C ou T,

R représente A ou G,

N représente A, C, G ou T.

A ce titre, l'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée

5 d'oligonucléotides 5' choisis parmi les suivants :

PTLVE5'140a AAYTTYACNCAAGAAGT

PTLVE5'140b AAYTTYACNCAGGAAGT

PTLVE5'140c AAYTTYACNCAAGAGGT

PTLVE5'140d AAYTTYACNCAGGAGGT

10 Y et N étant tels que définis ci-dessus.

L'invention concerne plus particulièrement encore l'utilisation susmentionnée, d'oligonucléotides 3' issus du brin ADN (-) correspondant au fragment polypeptidique 140-145 défini ci-dessus, lesdits oligonucléotides étant choisis parmi ceux de formule suivante :

NACYTCYTGNGTRAARTT

15 dans laquelle :

Y représente C ou T,

R représente A ou G,

N représente A, C, G ou T.

A ce titre l'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée,

20 d'oligonucléotides 3' choisis parmi les suivants :

PTLVE3'145a NACYTCYTGNGTAAAATT

PTLVE3'145b NACYTCYTGNGTGAAATT

PTLVE3'145c NACYTCYTGNGTAAAGTT

PTLVE3'145d NACYTCYTGNGTGAAGTT

25 Y et N étant tels que définis ci-dessus.

L'invention concerne plus particulièrement encore l'utilisation susmentionnée, d'oligonucléotides 3' issus du brin ADN (-) correspondant au fragment polypeptidique 222-228 défini ci-dessus, lesdits oligonucléotides étant choisis parmi ceux de formule suivante :

RMNACNATRCANSWRTARTT

30 dans laquelle :

R représente A ou G,

M représente A ou C,

S représente C ou G,

W représente A ou T,

N représente A, C, G ou T.

A ce titre l'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée d'oligonucléotides 3' choisis parmi les suivants:

- 5 PTLVE3'228a RMNACNATRCANSAATAATT
 PTLVE3'228b RMNACNATRCANSAGTAATT
 PTLVE3'228c RMNACNATRCANSAATAGTT
 PTLVE3'228d RMNACNATRCANSAGTAGTT
 PTLVE3'228e RMNACNATRCANSTATAATT
 10 PTLVE3'228f RMNACNATRCANSTGTAATT
 PTLVE3'228g RMNACNATRCANSTATAGTT
 PTLVE3'228h RMNACNATRCANSTGTAGTT

R, M, S, et N étant tels que définis ci-dessus.

L'invention concerne plus particulièrement encore l'utilisation susmentionnée
 15 d'oligonucléotides 3' issus du brin ADN (-) correspondant au fragment polypeptidique 237-
 241 défini ci-dessus, lesdits oligonucléotides étant choisis parmi ceux de formule suivante :

RTANARNACRTGCCA

dans laquelle :

R représente A ou G,

20 N représente A, C, G ou T.

A ce titre l'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation susmentionnée d'oligonucléotides 3' choisis parmi les suivants:

PTLVE3'241a RTANARNACATGCCA

PTLVE3'241b RTANARNACGTGCCA

25 R, et N étant tels que définis ci-dessus.

L'invention concerne également l'utilisation susmentionnées d'oligonucléotides tels que définis ci-dessus, comportant à leur extrémité 5' une séquence comprenant un site de restriction, tels que les sites EcoRI, de séquence GAATTC, ou BamHI, de séquence GGATCC.

30 A ce titre, l'invention concerne plus particulièrement l'utilisation susmentionnée d'oligonucléotides tel que définis ci-dessus, caractérisés en ce que les oligonucléotides 5' issus du brin ADN (+) correspondant aux fragments polypeptidiques 83-88 ou 140-145 comprennent en 5' une séquence GGAAGAATTC, et en ce que les oligonucléotides 3' issus

du brin ADN (-) correspondant aux fragments polypeptidiques 140-145, 222-228, et 237-241 comprennent en 5' une séquence GGAAGGATCC.

L'invention a également pour objet l'utilisation susmentionnée d'oligonucléotides tels que définis ci-dessus en tant que sondes, le cas échéant marquées, pour la mise en œuvre de
5 procédés de détection susmentionnés de PTLV et de souches apparentées.

L'invention concerne également l'utilisation susmentionnée d'oligonucléotides tels que définis ci-dessus, en tant que couples d'amorces nucléotidiques pour la mise en œuvre de réactions de polymérisation en chaîne (PCR) pour la détection de toute souche de PTLV, ainsi que de toute souche de virus comportant des séquences apparentées aux SU des PTLV.

10 L'invention a plus particulièrement pour objet utilisation susmentionnée de couples d'amorces choisis de telle manière que :

- l'amorce 5' correspond à un oligonucléotide 5' issu du brin ADN (+) et comprenant environ 15 à environ 30 nucléotides correspondant à des fragments polypeptidiques d'environ 5 à environ 10 acides aminés issus de fragments protéiques délimités du côté N-terminal par
15 un acide aminé situé entre les positions 75 à 90, et du côté C-terminal par un acide aminé situé entre les positions 140 à 150 des protéines d'enveloppe des différentes souches des PTLV, notamment correspondant à des fragments polypeptidiques d'environ 5 à environ 10 acides aminés issus du fragment protéique délimité du côté N-terminal par l'acide aminé situé à la
20 position 83 et du côté C-terminal par l'acide aminé situé à la position 145 de la protéine d'enveloppe de la souche MT-2 de HTLV-1,

- l'amorce 3' correspond à un oligonucléotide 3' issu du brin ADN (-) et comprenant environ 15 à environ 30 nucléotides correspondant à des fragments polypeptidiques d'environ 5 à environ 10 acides aminés issus de fragments protéiques délimités du côté N-terminal par
25 un acide aminé situé entre les positions 125 à 145, et du côté C-terminal par un acide aminé situé entre les positions 230 à 245 des protéines d'enveloppe des différentes souches des PTLV, notamment correspondant à des fragments polypeptidiques d'environ 5 à environ 10 acides aminés issus du fragment protéique délimité du côté N-terminal par l'acide aminé situé à la position 140 et du côté C-terminal par l'acide aminé situé à la position 241 de la protéine d'enveloppe de la souche MT-2 de HTLV-1,

30 étant bien entendu que lesdites amorces 5' et 3' susmentionnées ne peuvent pas être complémentaires l'une de l'autre.

L'invention concerne plus particulièrement l'utilisation susmentionnée de couples d'amorces tels que définis ci-dessus, caractérisée en ce que l'amorce 5' est choisie parmi les oligonucléotides 5' issus du brin ADN (+) correspondant aux fragments polypeptidiques 83 – 88 ou 140-145 définis ci-dessus, telles que les amorces PTLVE 5'83 a et b et PTLVE 5' 140 a à d susmentionnés, et en ce que l'amorce 3' est choisie parmi les oligonucléotides 3' issus du brin ADN (-) correspondant aux fragments polypeptidiques 140 – 145, 222 – 228 ou 237 – 241 définis ci-dessus, telles que les amorces PTLVE 3'145 a à d, PTLV3'228 a à h, et PTLVE 3 '145 a à d, PTLV 3'228 a à h, et PTLVE 3'241 a et b susmentionnées.

L'invention concerne également les oligonucléotides tels que définis ci-dessus, en tant que tels.

L'invention a également pour objet un procédé de détection de toute souche de PTLV, à savoir de toute souche appartenant aux HTLV-1, HTLV-2, STLV-1, STLV-2, et STLV-3, ainsi que de toute souche de virus comportant des séquences apparentées aux SU des PTLV, telles que définies ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend :

- la mise en contact d'un couple d'amorces tel que défini ci-dessus avec l'ADN génomique ou l'ADN complémentaire dérivé à partir d'ARN extraits du contenu d'un échantillon biologique (tels que cellules sanguines, de moelle osseuse, biopsies, notamment de peau ou autres organes, ou frottis) susceptible de contenir des PTLV tels que définis ci-dessus,

- l'amplification de fragments d'ADN correspondant à un fragment protéique tel que défini ci-dessus et délimité du côté N-terminal par un acide aminé situé entre les positions 75 à 90, et du côté C-terminal par un acide aminé situé entre les positions 230 à 245 des protéines d'enveloppe des différentes souches de PTLV, ou de virus apparentés,

- la détection des fragments d'ADN amplifiés lors de l'étape précédente, cette détection pouvant être corrélée à la détection et le cas échéant à l'identification de PTLV tels que définis ci-dessus dans ledit échantillon biologique.

L'invention concerne plus particulièrement un procédé de détection tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce que l'étape d'amplification est effectuée dans les conditions suivantes :

- dénaturation à 94°C pendant 5 min,
- une première réaction PCR en conditions dites de « touch down » effectuée dans un milieu contenant de la Taq polymérase ou autres ADN polymérases fonctionnant à haute température, cette première réaction PCR comprenant :

. 15 cycles d'affilée « touch down » variant par la température d'élongation qui diminue de 1°C à chaque cycle comprenant :

- * une étape de dénaturation à 94°C pendant 15 sec,
- * une étape combinant appariement et élongation à une température variant entre 65°C et 50 °C pendant 20 sec,

. 30 cycles classiques comprenant :

- * une étape de dénaturation à 94°C pendant 15 sec,
- * une étape d'appariement à 50°C pendant 30 sec,
- * une étape d'élongation à 72°C pendant 30 sec,

10 – une deuxième réaction PCR effectuée sur un échantillon de produits obtenus dans le cadre de la première réaction PCR susmentionnée à l'aide de la même amorce 5' que dans le cas de la réaction PCR précédente, et d'une amorce 3' différente de celle utilisée dans la réaction PCR précédente, à savoir une amorce 3' dite « nichée » hybridant avec une région située plus en amont de la séquence codant pour la SU que l'amorce 3' utilisée à l'étape
15 précédente.

L'invention a plus particulièrement pour objet un procédé de détection tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce que l'étape de détection, et le cas échéant d'identification, est effectuée dans les conditions suivantes :

- ligation directe des fragments amplifiés lors de l'étape d'amplification dans un
20 plasmide tel que pCR4-TOPO (Invitrogen),
- transformation de bactéries avec le plasmide susmentionné comprenant un gène marqueur tel qu'un gène de résistance à un antibiotique, notamment à la kanamycine,
- repiquage de colonies bactériennes (notamment entre 10 et 100), culture, extraction de l'ADN, et séquençage (notamment à l'aide des amorces universelles T3 ou T7 dans le cas de
25 l'utilisation du vecteur pCR4-TOPO).

L'invention concerne également une trousse ou kit pour la mise en œuvre d'un procédé de détection tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend un couple d'amorces susmentionné, et, le cas échéant, les réactifs nécessaires à la mise en œuvre de la réaction d'amplification par PCR et pour la détection des fragments amplifiés.

30 L'invention a également pour objet l'application du procédé de détection défini ci-dessus au diagnostic de pathologies liées à une infection par un PTLV, ou par un virus comportant des séquences apparentées aux SU des PTLV, chez l'homme ou l'animal, telles

que les hémopathies, les maladies auto-immunes, les maladies inflammatoires, les maladies dégénératives.

A ce titre, l'invention concerne toute méthode de diagnostic in vitro de pathologies susmentionnées par mise en œuvre d'un procédé de détection défini ci-dessus, la détection de
5 fragments d'ADN amplifiés pouvant être corrélée au diagnostic desdites pathologies.

Le cas échéant, les méthodes de diagnostic in vitro de l'invention comprenant une étape supplémentaire d'identification de PTLV ou virus apparentés aux PTLV présents dans l'échantillon biologique, par séquençage des fragments d'ADN amplifiés.

L'invention a également pour objet l'application du procédé de détection défini ci-
10 dessus, au criblage et à l'identification de nouveaux agents infectieux chez l'homme ou l'animal, et plus particulièrement de nouvelles souches (ou variants) de virus susceptibles d'être classés dans les PTLV, ou de virus comportant des séquences apparentées aux SU des PTLV.

Les méthodes de criblage et d'identification susmentionnées de nouveaux agents
15 infectieux sont effectuées par mise en œuvre d'un procédé de détection défini ci-dessus et comprennent une étape supplémentaire d'identification des nouveaux variants de PTLV ou de virus apparentés par séquençage des fragments d'ADN amplifiés.

L'invention concerne également l'application du procédé de détection défini ci dessus au criblage de gènes de prédisposition ou de résistance à des pathologies chez l'homme ou
20 l'animal liées à la présence de séquences des PTLV ou de séquences apparentées, une infection par un PTLV, telles que les hémopathies, les maladies auto-immunes, les maladies dégénératives.

L'invention a également pour objet l'application du procédé de détection défini ci-
dessus, au criblage ou à la conception de nouveaux agents thérapeutiques comprenant des
25 séquences entières ou partielles des protéines d'enveloppe de nouveaux variants de PTLV ainsi détectés.

L'invention concerne également l'application du procédé de détection tel que défini ci-
dessus, au criblage ou à la conception de nouveaux vecteurs de thérapie cellulaire utilisant les
propriétés de tropisme des séquences entières ou partielles des protéines d'enveloppe de
30 nouveaux variants de PTLV ainsi détectés.

L'invention a également pour objet les nouveaux variants de PTLV et plus particulièrement de type HTLV-1 ou HTLV-2, tels qu'obtenus pour mise en œuvre d'un procédé de détection tel que défini ci-dessus.

A ce titre, l'invention a plus particulièrement pour objet le variant de type HTLV-1 tel qu'obtenu par mise en œuvre d'un procédé de détection défini ci-dessus, caractérisé en ce que sa protéine d'enveloppe est telle qu'elle comprend la séquence peptidique suivante :

5 I K K P N P N G G G Y Y L A S Y S D
P C S L K C P Y L G C Q S W T C P Y
T G A V S S P Y W K F Q Q D V

à savoir une séquence correspondant à la séquence délimitée par les acides aminés situés aux positions 89 à 139 de la protéine d'enveloppe de la souche MT-2 de HTLV-1, dans laquelle le résidu arginine (R) en position 94, et le résidu sérine (S) en position 101, sont
10 respectivement remplacés par un résidu proline (P) et un résidu leucine (L) indiqués en gras et soulignés.

Le variant de type HTLV-1 défini ci-dessus est davantage caractérisé en ce que la séquence nucléotidique codant pour sa protéine d'enveloppe est telle qu'elle comprend la séquence suivante :

15 ATT AAA AAG CCA AAC CCA AAT GGC GGA GGC TAT TAT TTA GCC TCT TAT TCA GAC
CCT TGT TCC TTA AAA TGC CCA TAC CTG GGG TGC CAA TCA TGG ACC TGC CCC TAT
ACA GGA GCC GTC TCC AGC CCC TAC TGG AAG TTT CAG CAA GAT GTC

à savoir une séquence correspondant à la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 265 à 417 de la séquence codant pour la protéine d'enveloppe de la souche MT-
20 2 de HTLV-1, dans laquelle G en position 281, C en position 302, et G en position 333, sont respectivement remplacés par C, T, et A indiqués en gras et soulignés.

L'invention concerne plus particulièrement le variant de type HTLV-1 tel qu'obtenu par mise en œuvre d'un procédé de détection défini ci-dessus, caractérisé en ce que sa protéine d'enveloppe est telle qu'elle comprend la séquence peptidique suivante :

25 V K K P N R N G G G Y Y L A S Y S D
P C S L K C P Y L G C Q S W T C P Y
T G A V S S P Y W K F Q Q D V

à savoir une séquence correspondant à la séquence délimitée par les acides aminés situés aux positions 89 à 139 de la protéine d'enveloppe de la souche MT-2 de HTLV-1, dans
30 laquelle le résidu isoleucine (I) en position 89, et le résidu sérine (S) en position 101, sont respectivement remplacés par un résidu valine (V) et un résidu leucine (L) indiqués en gras et soulignés.

Le variant de type HTLV-1 défini ci-dessus est davantage caractérisé en ce que la séquence nucléotidique codant pour sa protéine d'enveloppe est telle qu'elle comprend la séquence suivante :

5 GTT AAA AAG CCA AAC CGA AAT GGC GGA GGC TAT TAT TTA GCC TCT TAT TCA GAC
CCT TGT TCC TTA AAA TGC CCA TAC CTG GGG TGC CAA TCA TGG ACC TGC CCC TAT
ACA GGA GCC GTC TCC AGC CCC TAC TGG AAG TTT CAG CAA GAT GTC

10 à savoir une séquence correspondant à la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 265 à 417 de la séquence codant pour la protéine d'enveloppe de la souche MT-2 de HTLV-1, dans laquelle A en position 266, C en position 302, et G en position 333, sont respectivement remplacés par G, T, et A indiqués en gras et soulignés.

L'invention a plus particulièrement pour objet le variant de type HTLV-1 tel qu'obtenu par mise en œuvre d'un procédé de détection défini ci-dessus, caractérisé en ce que sa protéine d'enveloppe est telle qu'elle comprend la séquence peptidique suivante :

15 I K K P N R N G G G Y Y L A S Y S D
P C S L K C P Y L G C Q S W T C P Y
T G A V S S P Y W K F Q Q D V

20 à savoir une séquence correspondant à la séquence délimitée par les acides aminés situés aux positions 89 à 139 de la protéine d'enveloppe de la souche MT-2 de HTLV-1, dans laquelle le résidu sérine (S) en position 101, est remplacé par un résidu leucine (L) indiqué en gras et souligné.

Le variant de type HTLV-1 défini ci-dessus est davantage caractérisé en ce que la séquence nucléotidique codant pour sa protéine d'enveloppe est telle qu'elle comprend la séquence suivante :

25 ATT AAA AAG CCA AAC CGA AAT GGC GGA GGC TAT TAT TTA GCC TCT TAT TCA GAC
CCT TGT TCC TTA AAA TGC CCA TAC CTG GGG TGC CAA TCA TGG ACC TGC CCC TAT
ACA GGA GCC GTC TCC AGC CCC TAC TGG AAG TTT CAA CAA GAT GTC

30 à savoir une séquence correspondant à la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 265 à 417 de la séquence codant pour la protéine d'enveloppe de la souche MT-2 de HTLV-1, dans laquelle C en position 302, G en position 333, et G en position 408, sont respectivement remplacés par T, A, et A indiqués en gras et soulignés.

L'invention concerne plus particulièrement le variant de type HTLV-1 tel qu'obtenu par mise en œuvre d'un procédé de détection défini ci-dessus, caractérisé en ce que sa protéine d'enveloppe est telle qu'elle comprend la séquence peptidique suivante :

I K K P N R N G G G Y Y L A S Y S D
 P C S L K C P Y L G C Q S W T C P Y
 T G P V S S P Y W K F Q Q D V

à savoir une séquence correspondant à la séquence délimitée par les acides aminés situés
 5 aux positions 89 à 139 de la protéine d'enveloppe de la souche MT-2 de HTLV-1, dans
 laquelle le résidu alanine (A) en position 127, est remplacé par un résidu proline (P) indiqué
 en gras et souligné.

Le variant de type HTLV-1 défini ci-dessus est davantage caractérisé en ce que la
 séquence nucléotidique codant pour sa protéine d'enveloppe est telle qu'elle comprend la
 10 séquence suivante :

GTT AAA AAG CCA AAC CGA AAT GGC GGA GGC TAT TAT TTA GCC TCT TAT TCA GAC
 CCT TGT TCC TTA AAA TGC CCA TAC CTG GGG TGC CAA TCA TGG ACC TGC CCC TAT
 ACA GGA CCC GTC TCC AGC CCC TAC TGG AAG TTT CAG CAA GAT GTC

à savoir une séquence correspondant à la séquence délimitée par les nucléotides situés
 15 aux positions 265 à 417 de la séquence codant pour la protéine d'enveloppe de la souche MT-
 2 de HTLV-1, dans laquelle G en position 379, est remplacé par C indiqué en gras et souligné.

L'invention a plus particulièrement pour objet le variant de type HTLV-2 tel qu'obtenu
 par mise en œuvre d'un procédé de détection défini ci-dessus, caractérisé en ce que sa protéine
 d'enveloppe est telle qu'elle comprend la séquence peptidique suivante :

20 I R K P N R Q G L G Y Y S P S Y N D
 P C S L Q C P Y L G S Q S W T C P Y
 T A P V S T P S W N F H S D V

à savoir une séquence correspondant à la séquence délimitée par les acides aminés situés
 aux positions 85 à 135 de la protéine d'enveloppe de la souche prototype NRA de HTLV-2
 25 (décrite par Lee et al., 1993. Virology 196, 57-69 ; n° d'accès Genbank L20734.1), dans
 laquelle les résidus lysine (K) en position 86, cystéine (C) en position 113, glycine (G) en
 position 122, sérine (S) en position 126, et lysine (K) en position 130, sont respectivement
 remplacés par les résidus arginine (R), sérine (S), alanine (A), thréonine (T), et asparagine (N)
 indiqués en gras et soulignés.

Le variant de type HTLV-2 défini ci-dessus est davantage caractérisé en ce que la
 séquence nucléotidique codant pour sa protéine d'enveloppe est telle qu'elle comprend la
 séquence suivante :

35 ATA AGA AAG CCA AAC AGA CAG GGC CTA GGG TAC TAC TCG CCT TCC TAC AAT GAC
 CCT TGC TCG CTA CAA TGC CCC TAC TTG GGC TCC CAA TCA TGG ACA TGC CCA TAC
 ACG GCC CCC GTC TCC ACT CCA TCC TGG AAT TTT CAT TCA GAT GTA

à savoir une séquence correspondant à la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 253 à 405 de la séquence codant pour la protéine d'enveloppe de la souche NRA de HTLV-2, dans laquelle A en position 257, G en position 258, T en position 267, A en position 282, C en position 294, T en position 300, A en position 333, G en position 338, G en position 365, G en position 377, G en position 390, et C en position 396, sont respectivement
5 remplacés par G, A, C, G, T, C, G, C, C, C, T, et T indiqués en gras et soulignés.

L'invention concerne également les polypeptides correspondants aux fragments d'ADN amplifiés dans le cadre de la détection des variants de type HTLV-1 et HTLV-2 susmentionnés.

10 A ce titre, l'invention a plus particulièrement pour objet les polypeptides suivants :

- le polypeptide 1 caractérisé en ce qu'il comprend la séquence peptidique suivante :

I	K	K	P	N	<u>P</u>	N	G	G	G	Y	Y	<u>L</u>	A	S	Y	S	D
P	C	S	L	K	C	P	Y	L	G	C	Q	S	W	T	C	P	Y
T	G	A	V	S	S	P	Y	W	K	F	Q	Q	D	V			

15 à savoir une séquence correspondant à la séquence délimitée par les acides aminés situés aux positions 89 à 139 de la protéine d'enveloppe de la souche MT-2 de HTLV-1, dans laquelle le résidu arginine (R) en position 94, et le résidu sérine (S) en position 101, sont respectivement remplacés par un résidu proline (P) et un résidu leucine (L) indiqués en gras et soulignés,

20 - le polypeptide 2 caractérisé en ce qu'il comprend la séquence peptidique suivante :

<u>V</u>	K	K	P	N	R	N	G	G	G	Y	Y	<u>L</u>	A	S	Y	S	D
P	C	S	L	K	C	P	Y	L	G	C	Q	S	W	T	C	P	Y
T	G	A	V	S	S	P	Y	W	K	F	Q	Q	D	V			

25 à savoir une séquence correspondant à la séquence délimitée par les acides aminés situés aux positions 89 à 139 de la protéine d'enveloppe de la souche MT-2 de HTLV-1, dans laquelle le résidu isoleucine (I) en position 89, et le résidu sérine (S) en position 101, sont respectivement remplacés par un résidu valine (V) et un résidu leucine (L) indiqués en gras et soulignés,

- le polypeptide 3 caractérisé en ce qu'il comprend la séquence peptidique suivante :

30 I K K P N R N G G G Y Y **L** A S Y S D
P C S L K C P Y L G C Q S W T C P Y
T G A V S S P Y W K F Q Q D V

à savoir une séquence correspondant à la séquence délimitée par les acides aminés situés aux positions 89 à 139 de la protéine d'enveloppe de la souche MT-2 de HTLV-1, dans

laquelle le résidu sérine (S) en position 101, est remplacé par un résidu leucine (L) indiqué en gras et souligné,

- le polypeptide 4 caractérisé en ce qu'il comprend la séquence peptidique suivante :

5 I K K P N R N G G G Y Y L A S Y S D
P C S L K C P Y L G C Q S W T C P Y
T G P V S S P Y W K F Q Q D V

à savoir une séquence correspondant à la séquence délimitée par les acides aminés situés aux positions 89 à 139 de la protéine d'enveloppe de la souche MT-2 de HTLV-1, dans laquelle le résidu alanine (A) en position 127, est remplacé par un résidu proline (P) indiqué en gras et souligné,

- le polypeptide 5 caractérisé en ce qu'il comprend la séquence peptidique suivante :

15 I R K P N R Q G L G Y Y S P S Y N D
P C S L Q C P Y L G S Q S W T C P Y
T A P V S T P S W N F H S D V

à savoir une séquence correspondant à la séquence délimitée par les acides aminés situés aux positions 85 à 135 de la protéine d'enveloppe de la souche prototype NRA de HTLV-2 (décrite par Lee et al., 1993. Virology 196, 57-69 ; n° d'accès Genbank L20734.1), dans laquelle les résidus lysine (K) en position 86, cystéine (C) en position 113, glycine (G) en position 122, sérine (S) en position 126, et lysine (K) en position 130, sont respectivement remplacés par les résidus arginine (R), sérine (S), alanine (A), thréonine (T), et asparagine (N) indiqués en gras et soulignés.

L'invention a plus particulièrement pour objet tout acide nucléique caractérisé en ce qu'il code pour un polypeptide tel que défini ci-dessus.

A ce titre, l'invention a plus particulièrement pour objet les acides nucléiques suivants :

25 - l'acide nucléique 1 a caractérisé en ce qu'il comprend la séquence suivante :

ATT AAA AAG CCA AAC CCA AAT GGC GGA GGC TAT TAT TTA GCC TCT TAT TCA GAC
CCT TGT TCC TTA AAA TGC CCA TAC CTG GGG TGC CAA TCA TGG ACC TGC CCC TAT
ACA GGA GCC GTC TCC AGC CCC TAC TGG AAG TTT CAG CAA GAT GTC

à savoir une séquence correspondant à la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 265 à 417 de la séquence codant pour la protéine d'enveloppe de la souche MT-2 de HTLV-1, dans laquelle G en position 281, C en position 302, et G en position 333, sont respectivement remplacés par C, T, et A indiqués en gras et soulignés,

ou toute séquence nucléotidique dérivée par dégénérescence du code génétique et codant pour le polypeptide 1 susmentionné,

- l'acide nucléique 2 a caractérisé en ce qu'il comprend la séquence suivante :

GTT AAA AAG CCA AAC CGA AAT GGC GGA GGC TAT TAT TTA GCC TCT TAT TCA GAC
CCT TGT TCC TTA AAA TGC CCA TAC CTG GGG TGC CAA TCA TGG ACC TGC CCC TAT
ACA GGA GCC GTC TCC AGC CCC TAC TGG AAG TTT CAG CAA GAT GTC

5 à savoir une séquence correspondant à la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 265 à 417 de la séquence codant pour la protéine d'enveloppe de la souche MT-2 de HTLV-1, dans laquelle A en position 266, C en position 302, et G en position 333, sont respectivement remplacés par G, T, et A indiqués en gras et soulignés,

10 ou toute séquence nucléotidique dérivée par dégénérescence du code génétique et codant pour le polypeptide 2 susmentionné,

- l'acide nucléique 3 a caractérisé en ce qu'il comprend la séquence suivante :

ATT AAA AAG CCA AAC CGA AAT GGC GGA GGC TAT TAT TTA GCC TCT TAT TCA GAC
CCT TGT TCC TTA AAA TGC CCA TAC CTG GGG TGC CAA TCA TGG ACC TGC CCC TAT
ACA GGA GCC GTC TCC AGC CCC TAC TGG AAG TTT CAA CAA GAT GTC

15 à savoir une séquence correspondant à la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 265 à 417 de la séquence codant pour la protéine d'enveloppe de la souche MT-2 de HTLV-1, dans laquelle C en position 302, G en position 333, et G en position 408, sont respectivement remplacés par T, A, et A indiqués en gras et soulignés,

20 ou toute séquence nucléotidique dérivée par dégénérescence du code génétique et codant pour le polypeptide 3 susmentionné,

- l'acide nucléique 4 a caractérisé en ce qu'il comprend la séquence suivante :

GTT AAA AAG CCA AAC CGA AAT GGC GGA GGC TAT TAT TTA GCC TCT TAT TCA GAC
CCT TGT TCC TTA AAA TGC CCA TAC CTG GGG TGC CAA TCA TGG ACC TGC CCC TAT
ACA GGA CCC GTC TCC AGC CCC TAC TGG AAG TTT CAG CAA GAT GTC

25 à savoir une séquence correspondant à la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 265 à 417 de la séquence codant pour la protéine d'enveloppe de la souche MT-2 de HTLV-1, dans laquelle G en position 379, est remplacé par C indiqué en gras et souligné,

ou toute séquence nucléotidique dérivée par dégénérescence du code génétique et codant pour le polypeptide 4 susmentionné.

30 - l'acide nucléique 5 a caractérisé en ce qu'il comprend la séquence suivante :

ATA AGA AAG CCA AAC AGA CAG GGC CTA GGG TAC TAC TCG CCT TCC TAC AAT GAC
CCT TGC TCG CTA CAA TGC CCC TAC TTG GGC TCC CAA TCA TGG ACA TGC CCA TAC
ACG GCC CCC GTC TCC ACT CCA TCC TGG AAT TTT CAT TCA GAT GTA

35 à savoir une séquence correspondant à la séquence délimitée par les nucléotides situés aux positions 253 à 405 de la séquence codant pour la protéine d'enveloppe de la souche NRA

de HTLV-2, dans laquelle A en position 257, G en position 258, T en position 267, A en position 282, C en position 294, T en position 300, A en position 333, G en position 338, G en position 365, G en position 377, G en position 390, et C en position 396, sont respectivement remplacés par G, A, C, G, T, C, G, C, C, C, T, et T indiqués en gras et soulignés,

5 ou toute séquence nucléotidique dérivée par dégénérescence du code génétique et codant pour le polypeptide 5 susmentionné.

L'invention concerne également les anticorps polyclonaux ou monoclonaux dirigés contre un nouveau variant de type HTLV – 1 ou HTLV – 2 tel que défini ci-dessus, ou contre un polypeptide 1 à 5 défini ci-dessus, lesdits anticorps étant tels qu'obtenus par immunisation
10 d'un animal approprié avec un polypeptide susmentionné.

L'invention a également pour objet toute composition pharmaceutique, notamment vaccins ou vecteurs thérapeutiques, conçus à partir des nouveaux variants de type HTLV-1 ou HTLV-2 tels que définis ci-dessus, et plus particulièrement toute composition pharmaceutique comprenant, un polypeptide 1 à 5 défini ci-dessus ou un acide nucléique 1a à 5a défini ci-
15 dessus, ou des anticorps susmentionnés, le cas échéant en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

L'invention sera davantage illustrée à l'aide de la description détaillée qui suit de l'obtention d'amorces selon l'invention et de leur utilisation pour la détection de nouveau variants de HTLV.

20

I. MISE AU POINT D'OUTILS MOLECULAIRES ET DE STRATEGIES DE DETECTION DE SEQUENCES PAN-PTLV PAR AMPLIFICATION, CLONAGE ET SEQUENÇAGE, DE SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES APPARENTEES AUX SU DES ENVELOPPES PTLV.

25

1. Recherche de motifs peptidiques conservés en N-terminus des SU de PTLV

La question principale résolue par les inventeurs est la mise au point d'outils et d'une méthode permettant d'amplifier, de cloner et d'identifier toute séquence nucléotidique apparentée à la SU des PTLV qui est responsable de la reconnaissance de leur récepteur
30 cellulaire (Kim et coll, 2000). Pour cela, les inventeurs ont cherché des motifs peptidiques conservés dans la SU des enveloppes de PTLV pour en déduire des séquences nucléotidiques permettant de les représenter toutes. Ces motifs peptidiques devaient répondre idéalement aux 5 critères suivants, selon leur importance décroissante:

- Etre conservés parmi la plupart, sinon la totalité, des séquences déjà décrites d'enveloppes de PTLV. Une telle conservation serait une garantie de leur efficacité potentielle dans la détection de nouvelles séquences de type PTLV.

5 - Représenter au moins 5 acides aminés conservés de la SU des PTLV, afin d'en dériver une séquence minimale de 15 nucléotides. En effet, étant donnée la complexité des génomes eucaryotes, ce minimum de 15 nucléotides est requis pour permettre la détection spécifique d'une séquence nucléotidique donnée.

10 - Permettre l'amplification de séquences situées en amont du motif C I/M V C qui est conservé dans la SU des PTLV et semble analogue au motif CWLC décrit dans la SU des MuLV (Sitbon et coll, 1991). Ce motif semble en effet, marquer une région charnière entre, en son amont, la partie de la SU responsable de la reconnaissance du récepteur et, en son aval, les domaines carboxy terminaux de la SU impliqués dans l'association avec la TM et des étapes de l'entrée virale postérieures à la reconnaissance du récepteur (Battini, et coll, 1992; Battini et coll, 1995; Lavillette et coll, 1998; Kim et coll, 2000; Lavillette et coll, 2001). Etre
15 suffisamment distants les uns des autres pour permettre l'amplification d'un fragment dont la longueur augmenterait les chances de détection d'un polymorphisme éventuel entre différentes séquences.

- Etre situés de façon à permettre deux réactions d'amplifications d'ADN successives, dont la deuxième, nichée, est réalisée à partir des produits de la première amplification, et
20 permettrait l'amplification d'un fragment interne au premier fragment amplifié. Cette amplification nichée permettrait d'augmenter la probabilité d'amplification d'un fragment qui corresponde bien à une séquence apparentée à la SU des PTLV.

25 Selon ces critères, les inventeurs ont identifié les motifs d'acides aminés suivants, présents dans toutes ou la quasi-totalité des SU connues de PTLV, et pouvant se prêter au développement de cette stratégie :

- Motif peptidique 1 : Y L/V F P H W
- Motif peptidique 2 : N F T Q/R E V
- Motif peptidique 3 : N Y S/T C I/M V C
- 30 - Motif peptidique 4 : W H V L Y

2. Oligonucléotides dégénérés de synthèse correspondant aux motifs conservés dans la partie amino terminale de la SU des PTLV

À partir des séquences d'acides aminés des motifs peptidiques conservés identifiés ci-dessus et suivant la correspondance nucléotidique en application du code génétique eucaryote, les inventeurs ont déterminé des séquences nucléotidiques dégénérées (SND) qui ont servi de base pour la conception d'oligonucléotides de synthèse (OS). Plusieurs critères ont présidé à la conception d'OS correspondants à ces SND :

- Lorsque la multiplication des positions dégénérées dans une SND faisait que la complexité de l'OS correspondant dépasse 512 oligonucléotides dans le mélange de synthèse, la synthèse d'OS supplémentaires pour cette SND est alors effectuée pour lever une partie de cette complexité.

- La synthèse d'un ou 2 OS supplémentaires, dans la limite de 4 OS par SND, est effectuée même pour des complexités inférieures à 512, lorsque ces OS supplémentaires lèvent significativement la complexité de l'OS dégénéré initial.

- Les séquence des OS 5', dont l'élongation par les polymérase d'ADN doit correspondre aux acides aminés situés en aval du motif peptidique considéré (motifs 1 et 2), sont celles du brin ADN (+), alors que celles des OS 3', à partir desquels l'élongation doit correspondre aux acides aminés situés en amont du motif peptidique considéré (motifs 2, 3 et 4), sont celles du brin ADN (-). Les OS correspondants au motif peptidique 2 ont été synthétisés sur les deux brins, pour pouvoir effectuer une élongation dans les deux sens.

- Chaque OS comprend des nucléotides supplémentaires permettant d'introduire en 5' la séquence correspondant à un site de restriction, EcoRI pour les OS 5', BamHI pour les OS 3', et dans tous les cas une séquence GGAA 5'-terminale favorisant l'arrimage des polymérase et nucléases en amont du site de restriction.

- Suivant ces critères, les OS PTLVE5' (83 a et b, 140 a à d) et PTLVE3' (145 a à d, 228 a à h, 241 a et b) (pour *Primate T-Leukemia Virus-like Env*), définis ci-dessus ont été synthétisés respectivement pour des élongations en 5' ou 3' du motif ciblé.

3. Mise au point des conditions d'amplification avec les oligonucléotidiques sur des séquences témoins

Pour la mise au point de l'amplification de séquences reconnues par les OS décrits ci-dessus, les inventeurs ont utilisé des préparations ADN témoins de plasmide contenant la séquence d'enveloppe HTLV-1 et des préparations témoins dépourvues de cette séquence. La stratégie d'amplification d'ADN qui a été sélectionnée consiste à enchaîner deux réactions d'amplification par un mélange des polymérases Taq et Pwo sur thermocycler dans les conditions dites de "*touch-down*" et combinant 2 couples d'OS différents.

Les premiers résultats d'amplification probants et reproductibles (amplification spécifiques de séquences HTLV sans amplification sur les préparations témoins) sont ceux obtenus avec la combinaison des OS PTLVE5'83b et PTLVE3'240b, pour la première réaction d'amplification, suivie d'une 2^{ème} réaction combinant les OS PTLVE5'83b et PTLVE3'146a sur un échantillon de la 1^{ère} réaction. Dans les deux cas les conditions de "*touch-down*" incluent 15 cycles combinant chacun dénaturation à 94°C suivi d'une étape d'appariement et d'élongation effectuée à la même température, cette température étant comprise pour chaque cycle entre 65 et 50°C avec un pas décroissant de 1°C entre le 1^{er} et le 15^è cycle. Ces 15 cycles sont suivis de 30 cycles classiques d'amplification avec une température d'appariement à 50°C et d'élongation à 72°C.

4. Construction et séquençage d'une banque de fragments amplifiés à partir des réactions d'amplification

Un échantillon de la 2^{ème} réaction d'amplification décrite ci-dessus est utilisé pour générer une banque des séquences amplifiées. Pour cela 4 µl sur les 50 µl de la 2^{ème} réaction est utilisé pour ligation dans un vecteur de type pCR4-TOPO (Invitrogen) et transformation de bactéries. Entre 10 et 100 colonies résistantes à la kanamycine sont repiquées pour chaque ligation et mises en culture. L'ADN plasmidique de chaque colonie est analysé par séquençage en utilisant des séquences amorces universelles T3 et T7 du vecteur.

II PREMIERS RESULTATS OBTENUS A PARTIR D'ECHANTILLONS HUMAINS ET DE PRIMATES

Les conditions décrites ci-dessus ont été appliquées à trois types d'échantillons d'ADN :

- Des échantillons d'ADN génomique de "patients séroindéterminés", caractérisés par une sérologie suggérant une infection antérieure par HTLV mais chez lesquels aucun diagnostic définitif n'a pu être établi. Chez ces patients, notamment, une recherche par amplification d'ADN de séquences HTLV *gag*, *pol* ou *tax* sont négatives.

5 - Des échantillons d'ADN génomique de "patients HTLV-1" chez lesquels une infection HTLV-1 caractéristique a été identifiée.

- Des échantillons d'ADN génomique de singes Mangabey agiles (*Cercocebus Agilis*) qui présentent une sérologie PTLV positive et chez lesquels des séquences Tax HTLV-1 ou STLV-L ont pu être amplifiées.

10 L'application de la méthode décrite ci-dessus a permis de détecter la présence de séquences de type SU de PTLV chez les trois types d'échantillons, y compris chez les "patients séroindéterminés".

L'analyse des séquences et de leurs capacités codantes au niveau de la région de SU concernée a permis de faire les observations suivantes:

15

1. Résultats obtenus sur "patients séroindéterminés"

En appliquant la méthode décrite ci-dessus sur l'ADN d'un "patient séroindéterminé" (échantillon No. 424), décrit comme ne portant pas de séquence de type HTLV, les inventeurs ont pourtant pu amplifier et caractériser des séquences de type SU de PTLV.

20 Au niveau nucléotidique, les séquences identifiées à partir de l'échantillon No. 424 sont de plusieurs types : des séquences HTLV-1 identiques à celles déjà décrites dans la littérature et de nouveaux variants. Au niveau codant, les séquences nucléotidiques se traduisent en trois types de séquences :

- Des séquences d'acides aminés identiques à celles des souches HTLV-1 déjà connues.

25 - Des variants de souches HTLV-1 avec 1 ou 2 résidus jamais décrits auparavant.

- Des variants de souches HTLV-1 avec 1 ou 2 résidus décrits comme communs aux seules souches HTLV-2 ou STLV-L.

2. Résultats obtenus sur "patients HTLV-1 typiques"

30 Au niveau nucléotidique, les séquences amplifiées à partir de l'échantillon provenant du "patient HTLV-1" (échantillon No.422) sont soit typiquement HTLV-1, telles que déjà décrites dans la littérature, soit des variants avec des répercussions sur la capacité codante. Au niveau codant, les séquences nucléotidiques se traduisent en trois types de séquences :

- Des séquences d'acides aminés identiques aux souches connues HTLV-1.
- Des variants HTLV-1 avec 1 ou 2 résidus typiques des HTLV-2, combinés ou pas avec des résidus jamais décrits auparavant.
- Des variants HTLV-2 combinant quelques résidus décrits pour être communs aux seules souches HTLV-2 ou STLV-L, ceci combinés ou pas avec des résidus jamais décrits auparavant.

3. Résultats obtenus sur singes *Cercocebus Agilis*

La méthode de l'invention a aussi permis d'amplifier des séquences de type SU de PTLV chez tous les Mangabey Agiles (*Cercocebus Agilis*) testés qui avaient été identifiés comme séropositifs pour PTLV. Au niveau nucléotidique, les séquences amplifiées à partir de ces singes sont soit celles des isolats déjà décrits auparavant, soit des variants nucléotidiques avec répercussions sur la capacité codante. Au niveau codant, les séquences nucléotidiques se traduisent en trois types de séquences :

- Des séquences d'acides aminés identiques aux souches connues HTLV-1.
- Des séquences d'acides aminés identiques à l'isolat STLV-3/CTO-604 tout récemment décrit chez un Mangabey à tête rouge (*Cercocebus Torquatus*) (Meertens et coll, 2002)
- Des séquences d'acides aminés du type STLV-3/CTO-604 avec 1 ou 2 résidus typiques des HTLV-2

III. BIBLIOGRAPHIE

1. Battini, J. L., O. Danos, and J. M. Heard. 1995. Receptor-binding domain of murine leukemia virus envelope glycoproteins. *J Virol.* **69**(2):713-719.
2. Battini, J. L., J. M. Heard, and O. Danos. 1992. Receptor choice determinants in the envelope glycoproteins of amphotropic, xenotropic, and polytropic murine leukemia viruses. *J Virol.* **66**(3):1468-75.
3. Kim, F. J., I. Seiliez, C. Denesvre, D. Lavillette, F. L. Cosset, and M. Sitbon. 2000. Definition of an amino-terminal domain of the human T-cell leukemia virus type 1 envelope surface unit that extends the fusogenic range of an ecotropic murine leukemia virus. *J Biol Chem.* **275**(31):23417-20.

4. **Lavillette, D., M. Maurice, C. Roche, S. J. Russell, M. Sitbon, and F. L. Cosset.** 1998. A proline-rich motif downstream of the receptor binding domain modulates conformation and fusogenicity of murine retroviral envelopes. *J Virol.* **72**(12):9955-65.
5. **Lavillette, D., A. Ruggieri, S. J. Russell, and F. L. Cosset.** 2000. Activation of a cell entry pathway common to type C mammalian retroviruses by soluble envelope fragments. *J Virol.* **74**(1):295-304.
6. **Meertens, L., R. Mahieux, P. Mauclore, J. Lewis, and A. Gessain.** 2002. Complete Sequence of a Novel Highly Divergent Simian T-Cell Lymphotropic Virus from Wild-Caught Red-Capped Mangabeys (*Cercocebus torquatus*) from Cameroon: a New Primate T-
10 Lymphotropic Virus Type 3 Subtype. *J. Virol.* **76**(1):259-268.
7. **Sitbon, M., L. d'Auriol, H. Ellerbrok, C. Andre, J. Nishio, S. Perryman, F. Pozo, S. F. Hayes, K. Wehrly, P. Tambourin, F. Galibert, and B. Chesebro.** 1991. Substitution of leucine for isoleucine in a sequence highly conserved among retroviral envelope surface glycoproteins attenuates the lytic effect of the Friend murine leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**(13):5932-6.
15

REVENDEICATIONS

1. Utilisation d'oligonucléotides comprenant environ 15 à environ 30 nucléotides issus des séquences nucléotidiques codant pour des fragments polypeptidiques d'environ 5 à environ 10 acides aminés issus de fragments protéiques délimités du côté N-terminal par un acide aminé situé entre les positions 75 à 90, et du côté C-terminal par un acide aminé situé entre les positions 230 à 245 des protéines d'enveloppe des virus des lymphomes / leucémies T chez les primates, regroupés sous la désignation PTLV, ces virus étant encore désignés HTLV chez l'homme et STLV chez le singe, pour la mise en œuvre de procédés de détection de toute souche de PTLV, à savoir de toute souche appartenant aux HTLV-1, HTLV-2, STLV-1, STLV-2, et STLV-3.

2. Utilisation d'oligonucléotides selon la revendication 1, comprenant environ 15 à environ 30 nucléotides issus de séquences nucléotidiques codant pour des fragments polypeptidiques d'environ 5 à environ 10 acides aminés issus de fragments protéiques délimités des acides aminés situés aux positions 80 à 245, et plus particulièrement aux positions 83 à 241, de la protéine d'enveloppe de la souche MT-2 de HTLV-1.

3. Utilisation d'oligonucléotides selon la revendication 1 ou 2, issus de séquences nucléotidiques codant pour les fragments polypeptidiques 83-88, 140-145, 222-228, et 237-241, de la protéine d'enveloppe de la souche MT-2 de HTLV-1, à savoir les fragments suivants :

83-YL/VFPHW-88	SEQ ID NO : 1
140-NFTQ/REV-145	SEQ ID NO : 2
222-NYS/TCI/MVC-228	SEQ ID NO : 3
237-WHVLY-241	SEQ ID NO : 4

4. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, d'oligonucléotides 5' issus du brin ADN (+) correspondant :

- au fragment polypeptidique 83-88, lesdits oligonucléotides étant choisis parmi ceux de formule suivante :

TAYBTNTTYCCNCAYTGG SEQ ID NO : 5

dans laquelle :

Y représente C ou T,

B représente C, G ou T,

N représente A, C, G ou T,

tels que les oligonucléotides 5' choisis parmi les suivants :

PTLVE5'83a TAYBTNTTYCCNCACTGG SEQ ID NO : 6

5 PTLVE5'83b TAYBTNTTYCCNCATTGG SEQ ID NO : 7

Y, B et N étant tels que définis dans ci-dessus,

- au fragment polypeptidique 140-145, lesdits oligonucléotides étant choisis parmi ceux de formule suivante :

AAYTTYACNCARGARGT SEQ ID NO : 8

10 dans laquelle :

Y représente C ou T,

R représente A ou G,

N représente A, C, G ou T,

tels que les oligonucléotides 5' choisis parmi les suivants :

15 PTLVE5'140a AAYTTYACNCAAGAAGT SEQ ID NO : 9

PTLVE5'140b AAYTTYACNCAGGAAGT SEQ ID NO : 10

PTLVE5'140c AAYTTYACNCAAGAGGT SEQ ID NO : 11

PTLVE5'140d AAYTTYACNCAGGAGGT SEQ ID NO : 12

Y et N étant tels que définis ci-dessus.

20

5. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, d'oligonucléotides 3' issus du brin ADN (-) correspondant :

- au fragment polypeptidique 140-145, lesdits oligonucléotides étant choisis parmi ceux de formule suivante :

25 NACYTCYTGNGTRAARTT SEQ ID NO : 13

dans laquelle :

Y représente C ou T,

R représente A ou G,

N représente A, C, G ou T,

30 tels que les oligonucléotides 3' choisis parmi les suivants :

PTLVE3'145a NACYTCYTGNGTAAAATT SEQ ID NO : 14

PTLVE3'145b NACYTCYTGNGTGAAATT SEQ ID NO : 15

PTLVE3'145c NACYTCYTGNGTAAAGTT SEQ ID NO : 16

PTLVE3'145d NACYTCYTGNGTGAAGTT SEQ ID NO : 17

Y et N étant tels que définis ci-dessus,

- au fragment polypeptidique 222-228, lesdits oligonucléotides étant choisis parmi ceux de formule suivante :

RMNACNATRCANSWRTARTT SEQ ID NO : 18

5 dans laquelle :

R représente A ou G,

M représente A ou C,

S représente C ou G,

W représente A ou T,

10 N représente A, C, G ou T,

tels que les oligonucléotides 3' choisis parmi les suivants:

PTLVE3'228a RMNACNATRCANSAATAATT SEQ ID NO : 19

PTLVE3'228b RMNACNATRCANSAGTAATT SEQ ID NO : 20

PTLVE3'228c RMNACNATRCANSAATAGTT SEQ ID NO : 21

15 PTLVE3'228d RMNACNATRCANSAGTAGTT SEQ ID NO : 22

PTLVE3'228e RMNACNATRCANSTATAATT SEQ ID NO : 23

PTLVE3'228f RMNACNATRCANSTGTAATT SEQ ID NO : 24

PTLVE3'228g RMNACNATRCANSTATAGTT SEQ ID NO : 25

PTLVE3'228h RMNACNATRCANSTGTAGTT SEQ ID NO : 26

20 R, M, S, et N étant tels que définis ci-dessus,

- au fragment polypeptidique 237-241, lesdits oligonucléotides étant choisis parmi ceux de formule suivante :

RTANARNACRTGCCA SEQ ID NO : 27

dans laquelle :

25 R représente A ou G,

N représente A, C, G ou T,

tels que les oligonucléotides 3' choisis parmi les suivants:

PTLVE3'241a RTANARNACATGCCA SEQ ID NO : 28

PTLVE3'241b RTANARNACGTGCCA SEQ ID NO : 29

30 R, et N étant tels que définis ci-dessus.

6. Utilisation d'oligonucléotides selon l'une des revendications 1 à 5, en tant que couples d'amorces nucléotidiques pour la mise en œuvre de réactions de polymérisation en

chaîne (PCR) pour la détection de toute souche de PTLV, ainsi que de toute souche de virus comportant des séquences apparentées aux SU des PTLV.

7. Utilisation selon la revendication 6, de couples d'amorces choisis de telle manière
5 que :

- l'amorce 5' correspond à un oligonucléotide 5' issu du brin ADN (+) et comprenant environ 15 à environ 30 nucléotides correspondant à des fragments polypeptidiques d'environ 5 à environ 10 acides aminés issus de fragments protéiques délimités du côté N-terminal par un acide aminé situé entre les positions 75 à 90, et du côté C-terminal par un acide aminé situé
10 entre les positions 140 à 150 des protéines d'enveloppe des différentes souches des PTLV, notamment correspondant à des fragments polypeptidiques d'environ 5 à environ 10 acides aminés issus du fragment protéique délimité du côté N-terminal par l'acide aminé situé à la position 83 et du côté C-terminal par l'acide aminé situé à la position 145 de la protéine d'enveloppe de la souche MT-2 de HTLV-1,

15 - l'amorce 3' correspond à un oligonucléotide 3' issu du brin ADN (-) et comprenant environ 15 à environ 30 nucléotides correspondant à des fragments polypeptidiques d'environ 5 à environ 10 acides aminés issus de fragments protéiques délimités du côté N-terminal par un acide aminé situé entre les positions 125 à 145, et du côté C-terminal par un acide aminé situé entre les positions 230 à 245 des protéines d'enveloppe des différentes souches des
20 PTLV, notamment correspondant à des fragments polypeptidiques d'environ 5 à environ 10 acides aminés issus du fragment protéique délimité du côté N-terminal par l'acide aminé situé à la position 140 et du côté C-terminal par l'acide aminé situé à la position 241 de la protéine d'enveloppe de la souche MT-2 de HTLV-1,

25 étant bien entendu que lesdites amorces 5' et 3' susmentionnées ne peuvent pas être complémentaires l'une de l'autre.

8. Utilisation de couples d'amorces selon la revendication 6 ou 7, caractérisée en ce que l'amorce 5' est choisie parmi les oligonucléotides 5' selon la revendication 4, et en ce que l'amorce 3' est choisie parmi les oligonucléotides 3' selon la revendication 5.

30 9. Oligonucléotides tels que définis dans l'une des revendications 1 à 5.

10. Procédé de détection de toute souche de PTLV, à savoir de toute souche appartenant aux HTLV-1, HTLV-2, STLV-1, STLV-2, et STLV-3, ainsi que de toute souche de virus

comportant des séquences apparentées aux SU des PTLV, telles que définies dans la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend :

- la mise en contact d'un couple d'amorces tel que défini dans l'une des revendications 6 à 8, avec l'ADN génomique ou l'ADN complémentaire dérivé à partir d'ARN extraits du contenu d'un échantillon biologique (tels que cellules sanguines, de moelle osseuse, biopsies, notamment de peau ou autres organes, ou frottis) susceptible de contenir des PTLV tels que définis ci-dessus,
- l'amplification de fragments d'ADN codant pour un fragment des protéines d'enveloppe des différentes souches des PTLV tel que défini dans la revendication 1,
- la détection des fragments d'ADN amplifiés lors de l'étape précédente, cette détection pouvant être corrélée à la détection et le cas échéant à l'identification de PTLV tels que définis ci-dessus dans ledit échantillon biologique.

11. Trousse ou kit pour la mise en œuvre d'un procédé de détection selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il comprend un couple d'amorces tel que défini dans l'une des revendications 6 à 8, et, le cas échéant, les réactifs nécessaires à la mise en œuvre de la réaction d'amplification par PCR et pour la détection des fragments amplifiés.

12. Application du procédé de détection selon la revendication 10 :

- au diagnostic de pathologies liées à une infection par un PTLV, ou par un virus comportant des séquences apparentées aux SU des PTLV, chez l'homme ou l'animal, telles que les hémopathies, les maladies auto-immunes, les maladies inflammatoires, les maladies dégénératives,
- au criblage et à l'identification de nouveaux agents infectieux chez l'homme ou l'animal, et plus particulièrement de nouvelles souches, ou variants, de virus susceptibles d'être classés dans les PTLV, ou de virus comportant des séquences apparentées aux SU des PTLV,
- au criblage de gènes de prédisposition ou de résistance à des pathologies chez l'homme ou l'animal liées à la présence des PTLV ou de séquences apparentées, une infection par un PTLV, telles que les hémopathies, les maladies auto-immunes, les maladies dégénératives,
- au criblage ou à la conception de nouveaux agents thérapeutiques comprenant des séquences entières ou partielles des protéines d'enveloppe de nouveaux variants de PTLV ainsi détectés,

- au criblage ou à la conception de nouveaux vecteurs de thérapie cellulaire utilisant les propriétés de tropisme des séquences entières ou partielles des protéines d'enveloppe de nouveaux variants de PTLV ainsi détectés.

LISTE DE SEQUENCES

<110> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

<120> OLIGONUCLEOTIDES ISSUS DES SEQUENCES CODANT POUR
LA COMPOSANTE DE SURFACE DES PROTEINES D'ENVELOPPE
DES PTLV ET LEURS UTILISATIONS

<130> IFB 02 BC CNR PTLV

<140> FR 02/05001

<141> 2002-04-22

<160> 29

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 6
<212> PRT
<213> Human T-cell lymphotropic virus type 1

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> L ou V

<400> 1
Tyr Xaa Phe Pro His Trp
1 5

<210> 2
<211> 6
<212> PRT
<213> Human T-cell lymphotropic virus type 1

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> Q ou R

<400> 2
Asn Phe Thr Xaa Glu Val
1 5

<210> 3
<211> 7
<212> PRT
<213> Human T-cell lymphotropic virus type 1

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> S ou T

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> I ou M

<400> 3
 Asn Tyr Xaa Cys Xaa Val Cys
 1 5

<210> 4
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Human T-cell lymphotropic virus type 1

<400> 4
 Trp His Val Leu Tyr
 1 5

<210> 5
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> oligonucléotide 5' issu du brin ADN (+) correspondant
 au fragment polypeptidique 83-88 de la protéine
 d'enveloppe de la souche MT-2 de HTLV-1

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> C ou T

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> C, G ou T

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> A, C, G ou T

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> C ou T

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> A, C, G ou T

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> C ou T

<400> 5
 tanntntnc cncantgg

<210> 6

<211> 18
<212> ADN
<213> séquence artificielle

<220>

<223> oligonucléotide 5' issu du brin ADN (+) correspondant
au fragment polypeptidique 83-88 de la protéine
d'enveloppe de la souche MT-2 de HTLV-1

<220>

<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> C ou T

<220>

<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> C, G ou T

<220>

<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> A, C, G ou T

<220>

<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> C ou T

<220>

<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> A, C, G ou T

<400> 6

tanntnttnc cncactgg

18

<210> 7
<211> 18
<212> ADN
<213> séquence artificielle

<220>

<223> oligonucléotide 5' issu du brin ADN (+) correspondant
au fragment polypeptidique 83-88 de la protéine
d'enveloppe de la souche MT-2 de HTLV-1

<220>

<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> C ou T

<220>

<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> C, G ou T

<220>

<221> misc_feature
<222> (6)..(6)

<223> A, C, G ou T

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> C ou T

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> A, C, G ou T

<400> 7

tanntntnc cncattgg

18

<210> 8

<211> 17

<212> ADN

<213> séquence artificielle

<220>

<223> oligonucléotide 5' issu du brin ADN (+) correspondant au fragment polypeptidique 140-145 de la protéine d'enveloppe de la souche MT-2 de HTLV-1

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> C ou T

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> C ou T

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> A, C, G ou T

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> A ou G

<220>

<221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> A ou G

<400> 8

aanttnacnc angangt

17

<210> 9

<211> 17

<212> ADN

<213> séquence artificielle

<220>

<223> oligonucléotide 5' issu du brin ADN (+) correspondant
au fragment polypeptidique 140-145 de la protéine
d'enveloppe de la souche MT-2 de HTLV-1

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> C ou T

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> C ou T

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> A, C, G ou T

<400> 9

aanttnacnc aagaagt

17

<210> 10

<211> 17

<212> ADN

<213> séquence artificielle

<220>

<223> oligonucléotide 5' issu du brin ADN (+) correspondant
au fragment polypeptidique 140-145 de la protéine
d'enveloppe de la souche MT-2 de HTLV-1

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> C ou T

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> C ou T

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> A, C, G ou T

<400> 10

aanttnacnc aggaagt

17

<210> 11

<211> 17

<212> ADN

<213> séquence artificielle

<220>

<223> oligonucléotide 5' issu du brin ADN (+) correspondant
au fragment polypeptidique 140-145 de la protéine
d'enveloppe de la souche MT-2 de HTLV-1

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> C ou T

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> C ou T

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> A, C, G ou T

<400> 11
aanttnacnc aagaggt

17

<210> 12
<211> 17
<212> ADN
<213> séquence artificielle

<220>
<223> oligonucléotide 5' issu du brin ADN (+) correspondant
au fragment polypeptidique 140-145 de la protéine
d'enveloppe de la souche MT-2 de HTLV-1

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> C ou T

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> C ou T

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> A, C, G ou T

<400> 12
aanttnacnc aggaggt

17

<210> 13
<211> 18
<212> ADN
<213> séquence artificielle

<220>
<223> oligonucléotide 3' issu du brin ADN (-) correspondant
au fragment polypeptidique 140-145 de la protéine
d'enveloppe de la souche MT-2 de HTLV-1

<220>
<221> misc_feature

<222> (1)..(1)
<223> A, C, G ou T

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> C ou T

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> C ou T

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> A, C, G ou T

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> A ou G

<220>
<221> misc_feature
<222> (16)..(16)
<223> A ou G

<400> 13
nacntcntgn gtnaantt

18

<210> 14
<211> 18
<212> ADN
<213> séquence artificielle

<220>
<223> oligonucléotide 3' issu du brin ADN (-) correspondant
au fragment polypeptidique 140-145 de la protéine
d'enveloppe de la souche MT-2 de HTLV-1

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> A, C, G ou T

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> C ou T

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> C ou T

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> A, C, G ou T

<400> 14
nacntcntgn gtaaaatt

18

<210> 15
<211> 18
<212> ADN
<213> séquence artificielle

<220>
<223> oligonucléotide 3' issu du brin ADN (-) correspondant
au fragment polypeptidique 140-145 de la protéine
d'enveloppe de la souche MT-2 de HTLV-1

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> A, C, G ou T

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> C ou T

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> C ou T

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> A, C, G ou T

<400> 15
nacntcntgn gtgaaatt

18

<210> 16
<211> 18
<212> ADN
<213> séquence artificielle

<220>
<223> oligonucléotide 3' issu du brin ADN (-) correspondant
au fragment polypeptidique 140-145 de la protéine
d'enveloppe de la souche MT-2 de HTLV-1

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> A, C, G ou T

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> C ou T

<220>
<221> misc_feature

<222> (7)..(7)
<223> C ou T

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> A, C, G ou T

<400> 16
nacntcntgn gtaaagtt

18

<210> 17
<211> 18
<212> ADN
<213> séquence artificielle

<220>
<223> oligonucléotide 3' issu du brin ADN (-) correspondant
au fragment polypeptidique 140-145 de la protéine
d'enveloppe de la souche MT-2 de HTLV-1

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> A, C, G ou T

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> C ou T

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> C ou T

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> A, C, G ou T

<400> 17
nacntcntgn gtgaagtt

18

<210> 18
<211> 20
<212> ADN
<213> séquence artificielle

<220>
<223> oligonucléotide 3' issu du brin ADN (-) correspondant
au fragment polypeptidique 222-228 de la protéine
d'enveloppe de la souche MT-2 de HTLV-1

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> A ou G

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> A ou C

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> A, C, G ou T

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> A, C, G ou T

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> A ou G

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> A, C, G ou T

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> C ou G

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (14)..(14)
 <223> A ou T

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> A ou G

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> A ou G

<400> 18
 nnnacnatnc annwntanttt

20

<210> 19
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> oligonucléotide 3' issu du brin ADN (-) correspondant
 au fragment polypeptidique 222-228 de la protéine
 d'enveloppe de la souche MT-2 de HTLV-1

<220>
 <221> misc_feature

<222> (1)..(1)
 <223> A ou G

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> A ou C

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> A, C, G ou T

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> A, C, G ou T

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> A ou G

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (12)..(12)
 <223> A, C, G ou T

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> C ou G

<400> 19
 nnnacnatnc annaataatt

20

<210> 20
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> oligonucléotide 3' issu du brin ADN (-) correspondant
 au fragment polypeptidique 222-228 de la protéine
 d'enveloppe de la souche MT-2 de HTLV-1

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> A ou G

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> A ou C

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> A, C, G ou T

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> A, C, G ou T

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> A ou G

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> A, C, G ou T

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> C ou G

<400> 20
nnnacnatnc annagtaatt

20

<210> 21
<211> 20
<212> ADN
<213> séquence artificielle

<220>
<223> oligonucléotide 3' issu du brin ADN (-) correspondant
au fragment polypeptidique 222-228 de la protéine
d'enveloppe de la souche MT-2 de HTLV-1

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> A ou G

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> A ou C

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> A, C, G ou T

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> A, C, G ou T

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> A ou G

<220>

<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> A, C, G ou T

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> C ou G

<400> 21
nnnacnatnc annaatagtt

20

<210> 22
<211> 20
<212> ADN
<213> séquence artificielle

<220>
<223> oligonucléotide 3' issu du brin ADN (-) correspondant
au fragment polypeptidique 222-228 de la protéine
d'enveloppe de la souche MT-2 de HTLV-1

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> A ou G

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> A ou C

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> A, C, G ou T

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> A, C, G ou T

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> A ou G

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> A, C, G ou T

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> C ou G

<400> 22
nnnacnatnc annagtagtt

20

<210> 23
<211> 20
<212> ADN
<213> séquence artificielle

<220>
<223> oligonucléotide 3' issu du brin ADN (-) correspondant
au fragment polypeptidique 222-228 de la protéine
d'enveloppe de la souche MT-2 de HTLV-1

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> A ou G

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> A ou C

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> A, C, G ou T

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> A, C, G ou T

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> A ou G

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> A, C, G ou T

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> C ou G

<400> 23
nnnacnatnc anntataatt

20

<210> 24
<211> 20
<212> ADN
<213> séquence artificielle

<220>
<223> oligonucléotide 3' issu du brin ADN (-) correspondant
au fragment polypeptidique 222-228 de la protéine
d'enveloppe de la souche MT-2 de HTLV-1

<220>

<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> A ou G

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> A ou C

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> A, C, G ou T

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> A, C, G ou T

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> A ou G

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> A, C, G ou T

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> C ou G

<400> 24
nnnacnatnc anntgtaatt

20

<210> 25
<211> 20
<212> ADN
<213> séquence artificielle

<220>
<223> oligonucléotide 3' issu du brin ADN (-) correspondant
au fragment polypeptidique 222-228 de la protéine
d'enveloppe de la souche MT-2 de HTLV-1

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> A ou G

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(2)
<223> A ou C

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)

<223> A, C, G ou T

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> A, C, G ou T

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> A ou G

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> A, C, G ou T

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> C ou G

<400> 25

nnnacnatnc anntatagtt

20

<210> 26

<211> 20

<212> ADN

<213> séquence artificielle

<220>

<223> oligonucléotide 3' issu du brin ADN (-) correspondant
au fragment polypeptidique 222-228 de la protéine
d'enveloppe de la souche MT-2 de HTLV-1

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> A ou G

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> A ou C

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> A, C, G ou T

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> A, C, G ou T

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> A ou G

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> A, C, G ou T

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)..(13)
<223> C ou G

<400> 26
nnnacnatac anntgtagtt

20

<210> 27
<211> 15
<212> ADN
<213> séquence artificielle

<220>
<223> oligonucléotide 3' issu du brin ADN (-) correspondant
au fragment polypeptidique 237-241 de la protéine
d'enveloppe de la souche MT-2 de HTLV-1

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> A ou G

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> A, C, G ou T

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> A ou G

<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> A, C, G ou T

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> A ou G

<400> 27
ntanannacn tgcca

15

<210> 28
<211> 15
<212> ADN
<213> séquence artificielle

<220>
<223> oligonucléotide 3' issu du brin ADN (-) correspondant
au fragment polypeptidique 237-241 de la protéine

d'enveloppe de la souche MT-2 de HTLV-1

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> A ou G

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> A, C, G ou T

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> A ou G

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> A, C, G ou T

<400> 28
 ntanannaca tgcca

15

<210> 29
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> séquence artificielle

<220>
 <223> oligonucléotide 3' issu du brin ADN (-) correspondant
 au fragment polypeptidique 237-241 de la protéine
 d'enveloppe de la souche MT-2 de HTLV-1

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> A ou G

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> A, C, G ou T

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> A ou G

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> A, C, G ou T

<400> 29
 ntanannacg tgcca

15

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendications concernées	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	EP 0 384 566 A (WISTAR INST) 29 août 1990 (1990-08-29) * voir les oligonucléotides p. 7, l. 24 et p. 7, l. 50 *	1,2,9	C07H21/00 C12N15/48 C12Q1/68 C12Q1/70 C07K14/15
Y	---	3-8, 10-12	
X	RAMIREZ E. ET AL.: "Genetic characterization and phylogeny of human T-cell lymphotropic virus type I from Chile." VIRUS RESEARCH, vol. 84, 20 mars 2002 (2002-03-20), XP001148390 * voir en particulier p. 137, col. 1, l. 35, oligonucléotide SG294 *	1,9	
Y	---	3-8, 10-12	
Y	DUBE S. ET AL.: "Degenerate and specific PCR assays for the detection of bovine leukaemia virus and primate T cell leukaemia/lymphoma virus pol DNA and RNA: phylogenetic comparisons of amplified sequences from cattle and primates from around the world." JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 78, 1997, pages 1389-1398, XP002233752 * abrégé *	3-8, 10-12	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
A	GRAY G. S. ET AL.: "Envelope gene sequence of HTLV-1 isolate MT-2 and its comparison with other HTLV-1 isolates." VIROLOGY, vol. 177, 1990, pages 391-395, XP008014557 * figure 1 *		C12Q
		Date d'achèvement de la recherche	Examineur
		7 mars 2003	Pinta, V
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITES		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

**ABSENCE D'UNITÉ D'INVENTION
FEUILLE SUPPLÉMENTAIRE B**

Numéro de la demande

FA 623539
FR 0205001

La division de la recherche estime que la présente demande de brevet ne satisfait pas à l'exigence relative à l'unité d'invention et concerne plusieurs inventions ou pluralités d'inventions, à savoir :

1. revendications: 1-4, 6-12 (toutes partiellement)

oligonucléotides issus d'une séquence nucléotidique codant pour des fragments polypeptidiques de 5-10 acides aminés issus de fragments compris entre les positions 75-90 et 230-245 des protéines d'enveloppe des virus de lymphomes/leucémies T chez les primates, utilisation desdits oligonucléotides pour la détection de PTLV, procédé de détection de PTLV et applications dudit procédé utilisant lesdits oligonucléotides, et trousse comportant lesdits oligonucléotides,

où lesdits oligonucléotides sont issus de la séquence codant pour le fragment polypeptidique 83-88 (SEQ ID NO:1) et sont plus particulièrement choisis parmi les SEQ ID NO:5-7.

2. revendications: 1-12 (toutes partiellement)

oligonucléotides issus d'une séquence nucléotidique codant pour des fragments polypeptidiques de 5-10 acides aminés issus de fragments compris entre les positions 75-90 et 230-245 des protéines d'enveloppe des virus de lymphomes/leucémies T chez les primates, utilisation desdits oligonucléotides pour la détection de PTLV, procédé de détection de PTLV et applications dudit procédé utilisant lesdits oligonucléotides, et trousse comportant lesdits oligonucléotides,

où lesdits oligonucléotides sont issus de la séquence codant pour le fragment polypeptidique 140-145 (SEQ ID NO:2) et sont plus particulièrement choisis parmi les SEQ ID NO:8-17.

3. revendications: 1-3, 5-12 (toutes partiellement)

oligonucléotides issus d'une séquence nucléotidique codant pour des fragments polypeptidiques de 5-10 acides aminés issus de fragments compris entre les positions 75-90 et 230-245 des protéines d'enveloppe des virus de lymphomes/leucémies T chez les primates, utilisation desdits oligonucléotides pour la détection de PTLV, procédé de détection de PTLV et applications dudit procédé utilisant lesdits oligonucléotides, et trousse comportant lesdits oligonucléotides,

où lesdits oligonucléotides sont issus de la séquence codant pour le fragment polypeptidique 222-228 (SEQ ID NO:3) et sont plus particulièrement choisis parmi les SEQ ID NO:18-26.

4. revendications: 1-3, 5-12 (toutes partiellement)

oligonucléotides issus d'une séquence nucléotidique codant

**ABSENCE D'UNITÉ D'INVENTION
FEUILLE SUPPLÉMENTAIRE B**

Numéro de la demande

FA 623539
FR 0205001

La division de la recherche estime que la présente demande de brevet ne satisfait pas à l'exigence relative à l'unité d'invention et concerne plusieurs inventions ou pluralités d'inventions, à savoir :

pour des fragments polypeptidiques de 5-10 acides aminés issus de fragments compris entre les positions 75-90 et 230-245 des protéines d'enveloppe des virus de lymphomes/leucémies T chez les primates, utilisation desdits oligonucléotides pour la détection de PTLV, procédé de détection de PTLV et applications dudit procédé utilisant lesdits oligonucléotides, et trousse comportant lesdits oligonucléotides,

où lesdits oligonucléotides sont issus de la séquence codant pour le fragment polypeptidique 237-241 (SEQ ID NO:1) et sont plus particulièrement choisis parmi les SEQ ID NO:27-29.

La première invention a été recherchée.

La présente demande ne satisfait pas aux dispositions de l'article L.612-4 du CPI car elle concerne une pluralité d'inventions qui ne sont pas liées entre elles en formant un seul concept inventif général.

1. La présente demande porte sur une pluralité d'inventions relatives à la détection de virus des lymphomes/leucémies T chez les primates (PTLV).
2. Le concept commun liant ces inventions peut s'énoncer comme étant la provision d'oligonucléotides de 15 à 30 nucléotides issus de séquences codant des fragments protéiques compris entre les positions 75 à 90 et 230 à 245 des protéines d'enveloppe des PTLV.
3. La demande de brevet EP-A-0 384 566 (WISTAR Institute) décrit un oligonucléotide (p. 7, l. 24) servant à la détection de PTLV dont la séquence est constituée de 23 nucléotides correspondant aux positions 519-542 de la séquence nucléotidique de la protéine d'enveloppe de la souche MT-2 de HTLV-1 (GenBank M37747), ainsi qu'un oligonucléotide (p. 7, l. 50) servant à la détection de PTLV dont la séquence est constituée de 21 nucléotides correspondant aux positions 734-754 de la séquence nucléotidique de la protéine d'enveloppe de la souche MT-2 de HTLV-1.
4. Au vu de ce document, le concept général sous-jacent à la présente demande n'est pas nouveau et ne présente pas de caractère inventif, et la revendication indépendante 9 manque manifestement de nouveauté.
5. Le problème sous-jacent à la présente demande peut être reformulé comme étant de fournir des oligonucléotides alternatifs pouvant être utilisés pour la détection de séquences codant les protéines d'enveloppe de PTLV.
6. Les solutions apportées à ce problème sont les oligonucléotides issus de séquences codant pour les fragments polypeptidiques 83-88 (SEQ ID NO:1; SEQ ID NO:5-7), 140-145 (SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:8-17), 222-228 (SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:18-26), et 237-241 (SEQ ID NO:4; SEQ ID

**ABSENCE D'UNITÉ D'INVENTION
FEUILLE SUPPLÉMENTAIRE B**

Numéro de la demande

FA 623539
FR 0205001

La division de la recherche estime que la présente demande de brevet ne satisfait pas à l'exigence relative à l'unité d'invention et concerne plusieurs inventions ou pluralités d'inventions, à savoir :

NO:27-29).

7. Aucune caractéristique inventive ou relation technique particulière ne permettant de réunir l'ensemble de ces solutions, la demande ne satisfait pas à l'exigence d'unité d'invention selon l'article L.612-4 du CPI.

8. Les différentes inventions ont donc été formulées ci-dessus comme des sujets distincts, et la recherche a été effectuée pour la première invention.

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0205001 FA 623539

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.
 Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 07-03-2003
 Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0384566 A	29-08-1990	AU 4878890 A	02-08-1990
		CA 2008731 A1	27-07-1990
		EP 0384566 A2	29-08-1990
		JP 3139299 A	13-06-1991
